
Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf F. Maier

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**Funktionelle Untersuchung der Bedeutung der
Mutation G832A des *CLCNKA*-Promotors bei einer
Patientin mit renalem Salzverlust und Taubheit**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Phillipps-Universität vorgelegt

von

Lutz Werner Josef Pelken

aus Ibbenbüren

Marburg 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am 07. Juli 2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund
Referent: Prof. Dr. S. Waldegger
1. Koreferent: PD Dr. R. Preisig-Müller

Ich danke

Prof. Dr. Siegfried Waldegger

für alles, was er mir über Wissenschaft
und den Beruf des Kinderarztes beigebracht hat,

meinen Eltern

dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben,
auch daran, dass ich diese Promotion abgeben werde,

Christiane

dafür, dass es sie in meinem Leben gibt.

Abstract

Functional analysis of the significance of the G832A mutation of *CLCNKA*'s promoter in a patient with renal salt-wasting and deafness

Hereditary salt-losing tubulopathies are rare, but potentially life-threatening disorders. A better understanding of the genetic mechanisms underlying these diseases can lead to both earlier diagnosis of the affected patient and possibly a specific therapy, ultimately improving the care of our patients.

Bartter's syndrome with sensorineural deafness (BSND) is a particularly severe form of these tubulopathies, manifesting antenatally with polyhydramnios, subsequent premature labour and postnatally with deafness and renal salt wasting resulting in failure to thrive or even death. The molecular basis of this disorder was uncovered between 2001 and 2008. The chloride channels ClC-Ka and -Kb are expressed both in the kidney and the inner ear and are essential to renal salt reabsorption and the generation of the endochochlear electrochemical gradient. Mutations in either both ClC-channels, or their common subunit Barttin can lead to BSND.

Unfortunately, for a significant number of patients with different forms hereditary salt-losing tubulopathies, the mechanism behind their disease is still unknown. This study presents one such patient with a BSND phenotype, lacking the typical genetic defects.

The study shows that in this patient only one among the known genes leading to salt-losing tubulopathies, *CLCKNB* (encoding ClC-Kb), is affected. Since these mutations typically lead to a more benign phenotype than the one exhibited by this patient, the search for mutations was extended to the promoter of *CLCNKA*, the gene encoding the second chloride channel typically affected in BSND patients. Alongside several known single nucleotide polymorphisms only one

previously unknown mutation, dubbed G832A, was found in *CLCNKA*'s promoter. This mutation affects a nucleotide sequence commonly recognized by certain transcription factors. To elucidate the functional relevance of G832A, an established *in vitro* model for promoter-controlled gene expression was used in three different kidney cell lines.

These experiments showed a reduction of up to 77.5% of the expression of genes controlled by a promoter with the G832A mutation compared to the unaffected wildtype promoter.

Although one should always be careful when translating *in vitro* findings to phenotypes *in vivo*, these results, combined with the knowledge that this patient's phenotype typically results from mutations in both *CLCNKA* and *CLCNKB*, strongly hint that G832A contributes significantly to this patient's disorder.

Ultimately, this study, apart from elucidating the molecular basis of another patient's salt-losing tubulopathy, sheds a little more light on the still insufficiently understood field of compensatory mechanisms in patients with renal salt-wasting – or deafness. The step from the rather benign phenotype of classical Bartter's syndrome (where only *CLCNKB* is affected) to the much more severe antenatal form with sensorineural deafness seems to be a short one – only one mutation in *CLCNKA*'s promoter seems to be enough. It might be possible that this is due to an insufficient compensatory upregulation of *CLCNKA*, and the experiments elucidating this question should be subject of further studies.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. renale Regulation des Wasser- und Salzhaushaltes	6
1.2. Salzverlusterkrankungen des Nierentubulus	11
1.2.1. das klassische Bartter-Syndrom (Bartter III, OMIM ID #607364)	13
1.2.2. das antenatale Bartter-Syndrom (aBS, HPS, Bartter I / II, OMIM IDs #601678 / #241200)	14
1.2.3. Bartter-Syndrom mit sensoreruraler Taubheit (BSND, Bartter IVa / b, OMIM IDs #602522 / #613090)	15
1.2.4. Gitelman-Syndrom (GS, OMIM ID #263800), EAST-Syndrom (GS-ähnlich, MIM-ID #612780)	16
1.3. Chloridkanäle der CIC-Superfamilie	17
1.3.1. CIC-Ka (NCBI RefSeq NP_004061.3 und NP_001036169.1, NCBI GeneID 1187)	18
1.3.2. CIC-Kb (NCBI RefSeq NP_000076.2 und NP_001159417.1, NCBI GeneID 1188)	19
1.4. Elektrolyttransport im Innenohr	19
1.5. eukaryote Genexpression	21
1.5.1. Regulation der Transkription	23
1.5.1.1. Transkriptionsfaktoren	24
1.5.1.2. Promotoren	26
1.6. Hintergrund und Fragestellung dieser Arbeit	27
1.6.1. Fallbericht	27
1.6.2. offene Fragestellungen	28
2. Material und Methoden	30
2.1. Chemikalien und Reagenzien	30
2.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien	31

2.3. Methodik	32
2.3.1. Präparation genomischer DNS	32
2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.3.3. Mikrosatelliten-Analyse	33
2.3.4. Sequenzierung	34
2.3.4.1. Vorbereitung der Sequenzierung	35
2.3.4.2. Nachweis eines Fusionsfragmentes nach Deletion von <i>CLCNKB</i>	36
2.3.4.3. Sequenzierung des Promotors von <i>CLCNKA</i>	37
2.3.5. Klonierung	38
2.3.6. Mutagenese	39
2.3.7. Zellkultur	40
2.3.8. Transfektion	41
2.3.9. funktionelle Messungen der Promotor-Aktivität	42
2.3.10. statistische Auswertung	44
3. Ergebnisse	46
3.1. Mikrosatelliten-Analyse	46
3.1.1. <i>SLC12A1</i> , <i>KCNJ1</i> und <i>BSND</i>	46
3.1.2. <i>CLCNKB</i>	46
3.2. Sequenzierungen und Fusionsfragment-Analyse	47
3.2.1. Sequenzierung von <i>BSND</i>	47
3.2.2. Sequenzierung und Fusionsfragment <i>CLCNKB</i>	47
3.2.3. Sequenzierung <i>CLCNKA</i>	48
3.3. funktionelle Analyse der <i>CLCNKA</i> -Promotor-Mutation	50
3.3.1. Klonierung und Mutagenese	50
3.3.2. funktionelle Messungen der Promotor-Aktivität	51
3.3.2.1. HEK	52
3.3.2.2. MDCK	53
3.3.2.3. MDCT	54

4. Diskussion	57
4.1. Methodendiskussion	58
4.1.1. Phänotyp der Patientin und Planung der Experimente	58
4.1.2. Mikrosatelliten-Analyse	58
4.1.3. Sequenzierungen / Fusionsfragment <i>CLCNKB</i>	60
4.1.4. Zellkultur / funktionelle Untersuchungen	61
4.1.5. Statistik	63
4.2. Ergebnisdiskussion	64
4.2.1. <i>SLC12A1</i> , <i>KCNJ1</i> und <i>BSND</i>	64
4.2.2. Deletion von <i>CLCNKB</i> / Mutation des <i>CLCNKA</i> -Promotors	64
4.2.3. funktionelle Untersuchungen der G832A-Mutation	65
4.3. Schlussfolgerungen	68
4.4. Ausblick	69
5. Zusammenfassung	71
6. Literaturverzeichnis	73
7. Abbildungsverzeichnis	82
8. Tabellenverzeichnis	84
9. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	85
10. tabellarischer Lebenslauf	87
11. Verzeichnis der akademischen Lehrer	88
12. ehrenwörtliche Erklärung	89

1. Einleitung

1.1. renale Regulation des Wasser- und Salzhaushaltes

[Ashcroft 2000, Guyton und Hall 2005]

Die extrazelluläre Homöostase wird beim Menschen im Wesentlichen über die Nieren reguliert. Besondere Bedeutung hat hierbei die Regulation des Wasser- und Salzhaushaltes, sowie des pH-Wertes. Um einerseits eine effektive Elimination unerwünschter Blutbestandteile über den Urin, sowie andererseits einen möglichst geringen Verlust übriger Stoffe zu ermöglichen bedient sich die Niere dreier wesentlicher Funktionen: Filtration, Reabsorption und Sekretion. Erstere geschieht in den Nierenkörperchen, wo der Primärharn, der in seiner Zusammensetzung im Wesentlichen einem eiweißarmen Blutplasma entspricht, durch das Kapillarnetz der Glomerula in das Tubuluslumen abgepresst wird.

Durch die im proximalen Tubulus, der Henle'schen Schleife, dem distalen Tubulus und den Sammelrohren nachfolgende Reabsorption und Sekretion wird der Primärharn aufkonzentriert und in seiner Zusammensetzung so verändert, dass der Endharn entsteht.

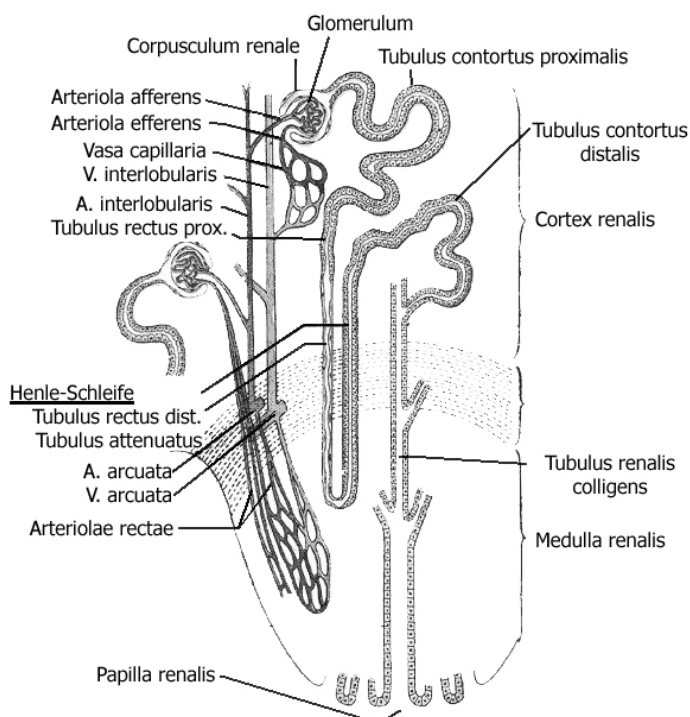


Abbildung 1.1:
schematische Darstellung
eines Nephrons.

Welche große Leistung dabei vom Tubulus-Apparat erbracht wird, wird deutlich, wenn man sich veranschaulicht, dass im Laufe eines Tages beim Erwachsenen knapp 1.500 Liter Blut die Nieren durchfließen, woraus um 170 Liter Primärharn (also gut eine Badewannenfüllung) entstehen, in dem gut 0,9% Salze, also 1.500 Gramm, gelöst sind; davon werden jedoch nur ca. fünf Gramm Salz (oder 0,3% der zuvor filtrierten Menge) in einem Volumen von einem halben bis drei Litern Endharn ausgeschieden.

Voraussetzung für die zugrundeliegenden Reabsorptions- und Selektionsprozesse ist zunächst eine dichte epitheliale Barriere zwischen dem Tubuluslumen und dem umgebenden Gewebe. Diese kann von verschiedenen Stoffen in den einzelnen Nephron-Abschnitten in unterschiedlichem Maße über spezifische oder unspezifische, aktive, sekundär-aktive oder passive Transportmechanismen überwunden werden. Aufgrund der hohen Bedeutung der Salz-Reabsorption, insbesondere in dem aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife und dem Sammelrohr, für die vorliegende Arbeit soll auf diese im Folgenden näher eingegangen werden.

Im proximalen Tubulus werden ungefähr zwei Drittel des filtrierten Wassers, Kochsalzes und der Kaliumionen (K^+) reabsorbiert. Hierbei werden die Natriumionen (Na^+) gegen Protonen (H^+) durch einen dem Tubuluslumen der Epithelzelle zugewandten ("apikalen") Antiporter, NHE3, in der Epithelzelle ausgetauscht. Zudem existieren verschiedene Symport-Prozesse, bei denen gelöste Stoffe gemeinsam mit Na^+ aus dem Tubuluslumen in die Epithelzellen aufgenommen werden. Motor dieser sekundär-aktiven Transportprozesse ist die relativ niedrigere Na^+ -Konzentration in der Epithelzelle, die durch eine dem Interstitium, bzw. Blut zugewandten ("basalen") $Na^+-K^+-ATPase$ unter Energieverbrauch aufrecht erhalten wird. Der Ausstrom von K^+ aus dem Tubulus in die Epithelzelle, sowie aus der Zelle ins Interstitium und nachfolgend ins Blut erfolgt entlang des Konzentrations-Gradienten.

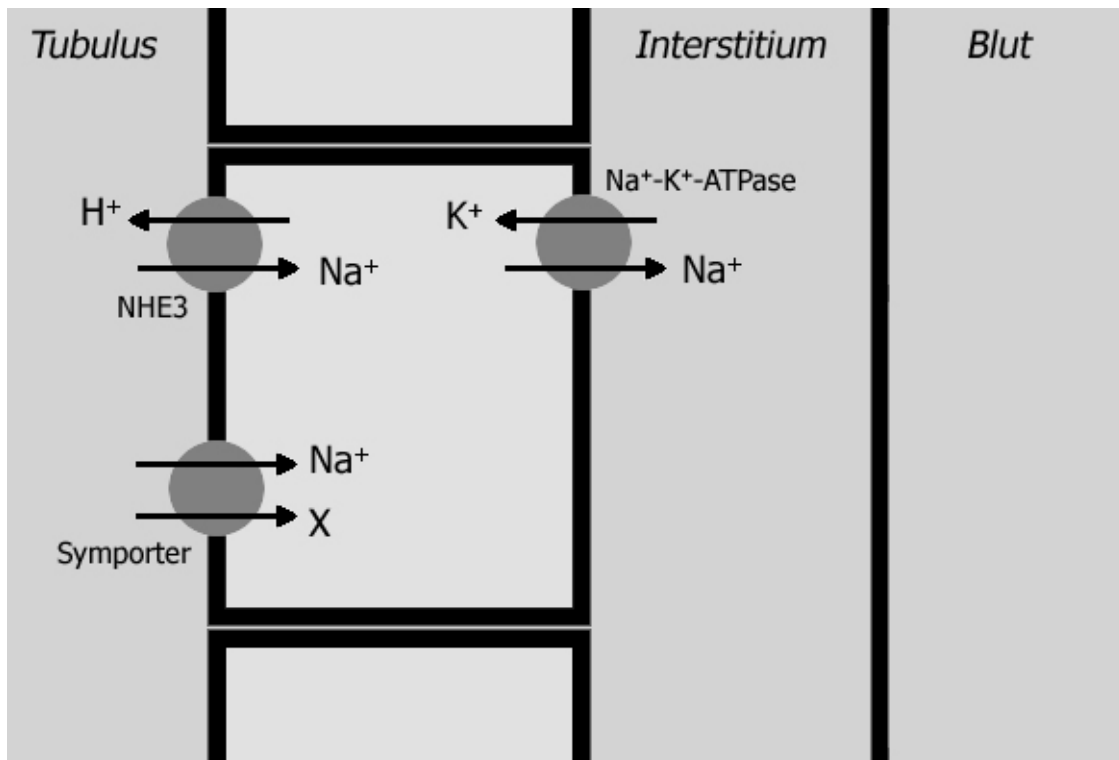


Abbildung 1.2: schematische Darstellung einiger Transportmechanismen am proximalen Tubulus

In der Henle'schen Schleife wird zunächst im absteigenden Schenkel Wasser passiv in das hyperosmolare Nierenmark resorbiert; für Salze ist dieser Tubulusabschnitt hingegen weitgehend nicht permeabel, so dass die Osmolalität im Tubuluslumen parallel zu der im Nierenmark ansteigt.

Im dünnen aufsteigenden Teil (tAL) der Henle-Schleife kehrt sich dieser Prozess um, da nun das Tubulusepithel für Wasser im Wesentlichen undurchlässig wird und durch passiven Ausstrom von Kochsalz entlang des Konzentrationsgradienten dieses ins Nierenmark reabsorbiert wird.

Der dicke aufsteigende Teil (TAL) der Henle-Schleife ist für Wasser praktisch nicht permeabel, hier wird jedoch gut ein Viertel des filtrierten Kochsalzes und Kaliums aktiv reabsorbiert. Der wesentliche apikale Transporter ist hier der durch Furosemid hemmbare Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter NKCC2 [Jeck et al. 2005]. Die relativ zum Tubuluslumen niedrigere Na^+ -Konzentration in der Epithelzelle wird wiederum durch die basolaterale Na^+ -K⁺-ATPase

aufrechterhalten, die Na^+ aus der Zelle gegen interstitielles K^+ austauscht. Chlorid (Cl^-) verlässt die Epithelzelle über ClC-Ka und -Kb in Richtung Interstitium; K^+ kehrt über den ROMK-Kanal zurück ins Tubuluslumen. Durch die beiden letztgenannten Prozesse entsteht im Tubuluslumen eine gegenüber dem Interstitium positive Ladung, die die parazelluläre Resorption von Na^+ antreibt.

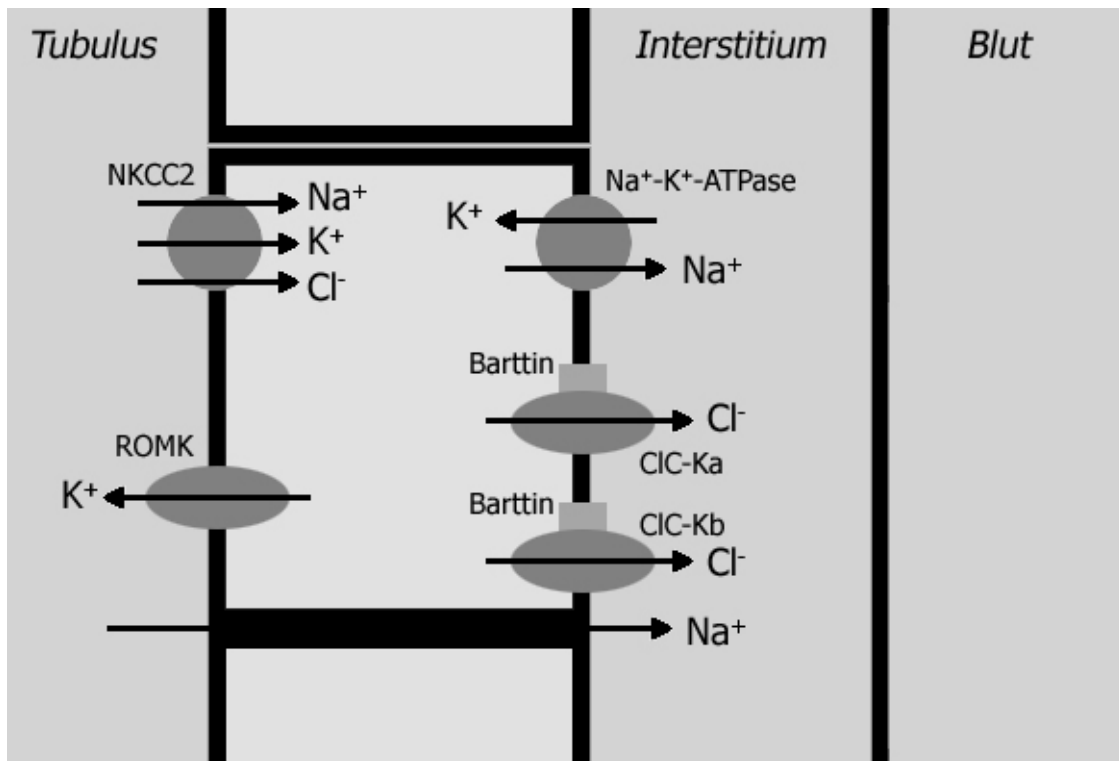


Abbildung 1.3: schematische Darstellung einiger Transportmechanismen im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife

Das folgende distale Konvolut ist für Wasser wieder permeabel, so dass hier ungefähr weitere zehn Prozent des filtrierten Wassers und eine ähnliche Menge Kochsalz resorbiert wird. Hier ist der wesentliche apikale Transporter der durch Thiazide hemmbare Natrium-Chlorid-Kotransporter NCCT. Die Energie für diesen Transport liefert eine $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$, Cl^- verlässt die Zelle wieder über basale Cl^- -Kanäle.

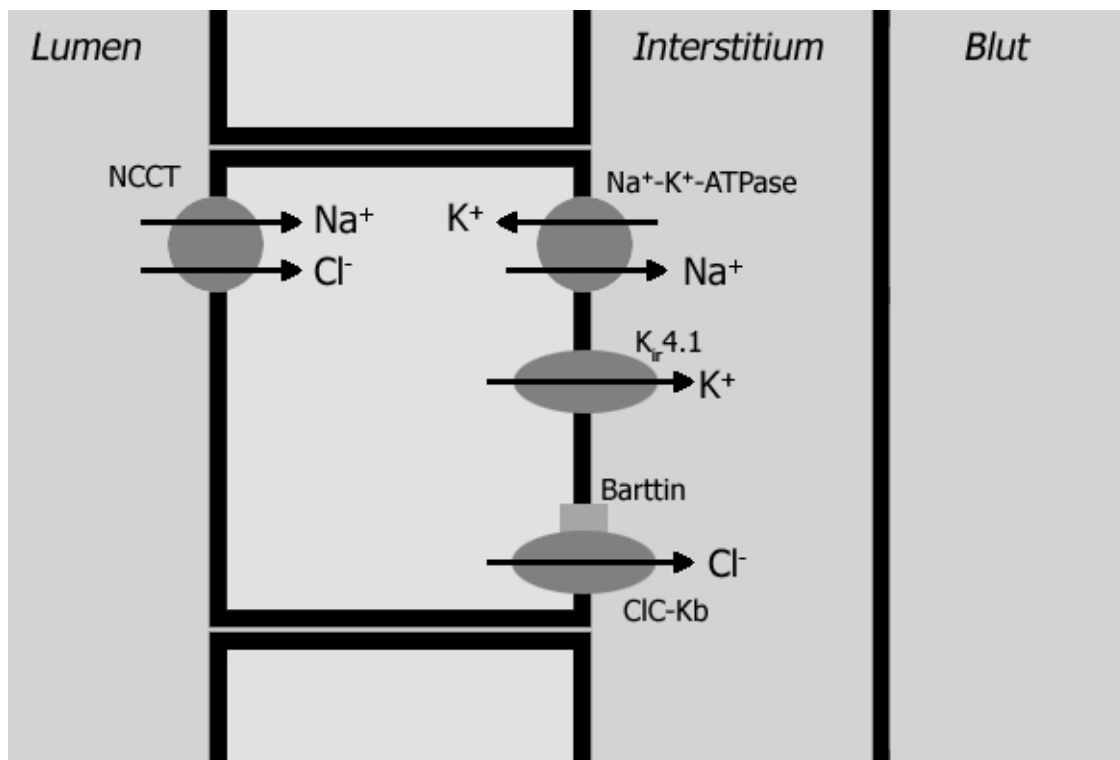


Abbildung 1.4: schematische Darstellung einiger Transportmechanismen im distalen Konvolut

Im letzten Abschnitt des Nephrons, dem Sammelrohr, werden nur noch ungefähr fünf Prozent des filtrierten Kochsalzes aktiv resorbiert, wobei dies allerdings gegebenenfalls auch, getrieben durch eine Na⁺-K⁺-ATPase, gegen einen hohen Konzentrationsgradienten geschehen kann. Die Expression des apikalen Na⁺-Kanals ENaC, über den diese Aufnahme geschieht, wird durch Aldosteron gesteigert; andererseits kann seine Aktivität durch K⁺-sparende Diuretika gehemmt werden, wodurch es netto zu einem Überwiegen der aktiven K⁺-Reabsorption über eine Kalium-Protonen-ATPase in den Zwischenzellen des Sammelrohres kommt.

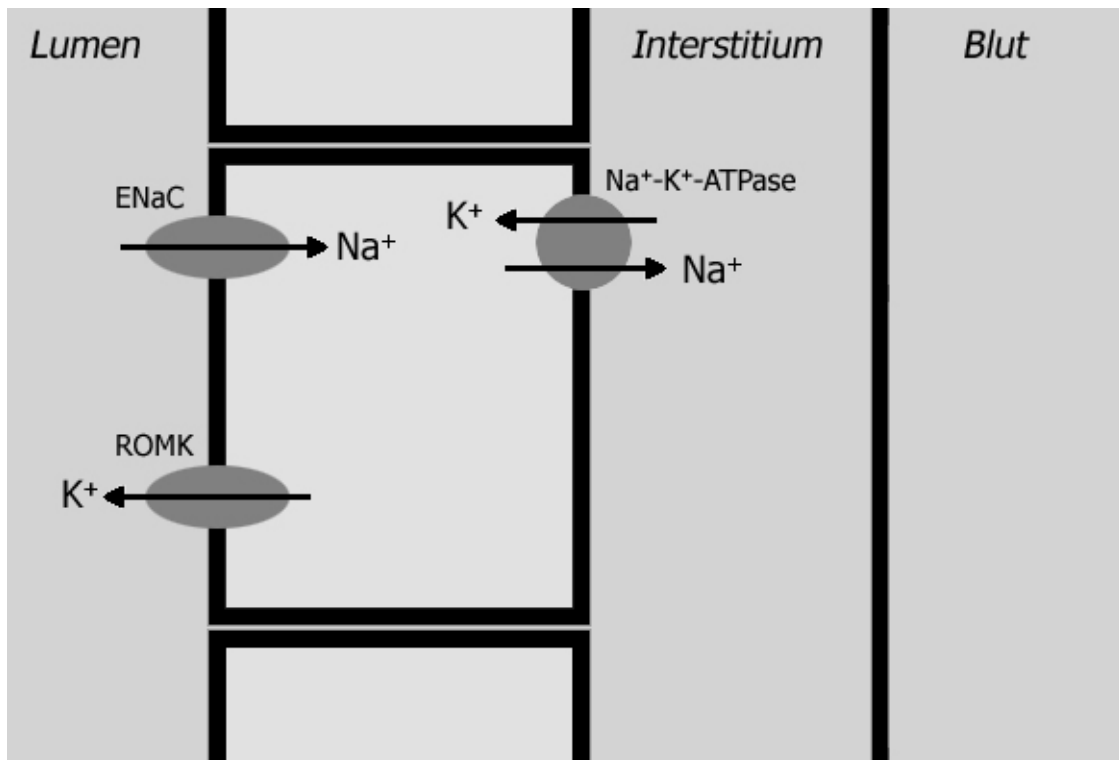


Abbildung 1.5: schematische Darstellung einiger Transportmechanismen im Sammelrohr

1.2. Salzverlusterkrankungen des Nierentubulus

Eine Funktionsstörung in einem oder mehreren dieser komplex interagierenden Systeme kann zu einem renalen Salz- und Wasserverlust führen. Salzverlust-Tubulopathien, die mit Hypokaliämie und metabolischer Alkalose einhergehen, werden traditionellerweise unter dem Begriff des Bartter-Syndroms zusammengefasst. Klinisch lässt sich eine weitere Unterteilung vornehmen: in das klassische Bartter-Syndrom (BS), das Gitelman-Syndrom (GS), das antenatale Bartter-Syndrom, oder ursprünglich auch Hyper-Prostaglandin-E-Syndrom (aBS/HPS), sowie dessen mit Taubheit einhergehende Variante BSND.

Seit den späten 1990er-Jahren konnten die genetischen Ursachen, die diesen klinische Phänotypen zugrunde liegen, aufgedeckt werden. Dabei überrascht es wenig, dass es sich bei den defekten Proteinen um renale Ionen-Kanäle und -Transporter handelt. Diese vermitteln die transepitheliale Salz-Reabsorption im

distalen Nephron und auch, wie beim BSND eindrücklich sichtbar, im Innenohr. Eine genetische Klassifikation des Bartter-Syndroms in die Typen I bis IV lässt sich gut mit den klinischen Varianten korrelieren (Tabelle 1.1).

genetische Klassifikation	Syndrom	Gen/ Chromosom	Protein/ Transporter	Lokalisation
Bartter I	aBS/HPS	<i>SLC12A1</i> 15q15-21	NKCC2	TAL
Bartter II	aBS/HPS	<i>KCNJ1</i> 11q24-25	ROMK	TAL, CD
Bartter III	(k)BS	<i>CLCNKB</i> 1p36	ClC-Kb	TAL, DCT
Bartter IVa	BSND	<i>BSND</i> 1p31	Barttin	tAL, TAL, DCT
Bartter IVb	BSND	<i>CLCNKA</i> und <i>CLCNKB</i> jeweils 1p36	ClC-Ka und ClC-Kb	tAL, TAL, DCT
Gitelman	GS	<i>SLC12A3</i> 16q13	NCCT	DCT
Gitelman-ähnlich	EAST	<i>KCNJ10</i> 1q23.2	KCN-J10	DCT

Tabelle 1.1: Genetische, sowie klinische Klassifikation des Bartter-Syndroms, betroffene Gene, sowie Genprodukte und ihre Lokalisation entlang des Nephrons.

1.2.1. das klassische Bartter-Syndrom (Bartter III, OMIM ID #607364)

Klinik: Das klassische BS manifestiert sich typischerweise innerhalb der ersten fünf Lebensjahre, wobei Patienten auch in der Neonatalperiode oder erst als Jugendliche symptomatisch werden können [Simon et al. 1997]. Klinisch zeigt sich eine Gedeihstörung, ein sekundärer Hyperaldosteronismus bei normalem Blutdruck, eine hypokaliämische Alkalose aufgrund eines renalen Kalium-Verlustes, sowie eine vermehrten renalen Prostaglandin-Produktion. Gelegentlich findet sich unter anderem eine Hypomagnesiämie, eine Hyperkalzämie und -phosphatämie mit nachfolgender Nephrokalzinose und Thrombozyten-Funktionsstörungen. Die Schwere der Symptome variiert dabei von milden Elektrolyt-Verschiebungen und Schwächegefühl bis hin zu schweren Imbalancen mit lebensbedrohlichen Salz- und Wasserverlusten. [Bartter et al. 1962, Arant et al. 1970, Dillon et al. 1979, DeJong et al. 1980, Stoff et al. 1980, Simon et al. 1997]

Therapie: Neben der Salzsubstitution führt eine dauerhafte Therapie mit dem Prostaglandin-Synthesehemmer Indometacin zu einer deutlichen Linderung der Symptome. [Dillon et al. 1979, DeJong et al. 1980]

Pathogenese: Bereits kurz nach der Erstbeschreibung konnte gezeigt werden, dass der zugrundeliegende Defekt in renalen Transportmechanismen liegt [Gardner et al. 1970], genauer in mangelhafter Chlorid-Rückresorption im TAL [Baehler et al. 1980, Ramos et al. 1980]. Schließlich konnten 1997 Mutationen in *CLCNKB* als ursächlich für das klassische BS nachgewiesen werden [Simon et al. 1997]. Hierbei führt der Ausfall von ClC-Kb zu einem unzureichenden Weitertransport von Cl⁻ ins Interstitium und somit zu einer Hemmung der Elektrolytaufnahme aus dem Tubulus (via NKCC2), vgl. Abb. 1.3.

1.2.2. das antenatale Bartter-Syndrom (aBS, HPS, Bartter I und II, OMIM IDs #601678 und #241200)

Klinik: Klinisch und anhand der üblichen Laborparameter lassen sich die beiden Subtypen Bartter I und II meist nicht unterscheiden. In beiden Fällen besteht eine Gedeihstörung, ein ausgeprägter Salzverlust bei Hyposthenurie, eine mäßiggradige hypokaliämische Alkalose, Durchfall, Erbrechen und Fieber. Diese Symptome rufen in der Regel ein wesentlich bedrohlicheres Bild hervor als beim klassischen BS. Charakteristisch für das aBS ist zudem eine Hyperprostaglandin-(E2)-ämie und -urie, sowie eine Hyperkalzurie mit nachfolgender Nephrokalzinose und Osteopenie. Ebenfalls im Gegensatz zum klassischen BS manifestiert sich das aBS bereits pränatal mit einem Polyhydramnion aufgrund ausgeprägter fetalen Polyurie und entsprechend der Gefahr der Frühgeburtlichkeit. Der einzige in der Literatur berichtete Unterschied zwischen den beiden Subtypen Bartter I und II besteht darin, dass beim BS Typ II in mehr als der Hälfte der Fälle im ersten Lebensmonat eine transiente Hyperkaliämie auftritt. [Ohlson et al. 1984, Seyberth et al. 1985, International Collaborative Study Group for Bartter-like Syndromes 1997, Peters et al. 2002, Finer et al. 2003]

Therapie: Im Falle einer bereits pränatal gesicherten Diagnose kann eine systemische Therapie der Mutter mit Indometacin ein Fortschreiten des Polyhydramnions aufhalten und somit das Risiko der Frühgeburtlichkeit mindern. Postnatal führt ebenfalls eine Therapie mit Indometacin, sowie eine Flüssigkeits- und Elektrolyt-Substitution, zu einer Linderung der Symptomatik, bzw. kann deren Auftreten verhindern. Seit Ende der 1990er Jahre wurde an Stelle der Therapie mit Indometacin eine selektive Hemmung der Cyclooxygenase 2 (COX 2) diskutiert, die bei gleicher Wirksamkeit weniger Nebenwirkungen erwarten lässt, sich im klinischen Alltag allerdings bisher nicht durchsetzte. [Konrad et al. 1999, Kleta et al. 2000]

Pathogenese: Die genetische Ursache für das aBS wurde 1996 in Defekten des für des Furosemid-sensitiven Transporters NKCC2 kodierenden Gens *SLC12A1* (Bartter Typ I), bzw. des für den Kaliumkanal ROMK kodierenden Gens *KCNJ1* (Bartter Typ II) gefunden. Der renale Salzverlust basiert auf der mangelhaften Funktion der Kochsalz-Reabsorption durch NKCC2 – beim BS Typ I durch einen Defekt des Transporters selbst, beim BS Typ II aufgrund des mangelnden durch ROMK vermittelten Recyclings des aufgenommenen Kaliums, vgl. Abb. 1.3. [Simon et al. 1996 (2+3), International Collaborative Study Group for Bartter-like Syndromes 1997]

1.2.3. Bartter-Syndrom mit sensoneuraler Taubheit (BSND, Bartter IVa und b, OMIM IDs #602522 und #613090)

Klinik: Beim BSND kommt es neben den meisten der Symptome des unter 1.2.2. beschriebenen aBS zu einer Innenohrtaubheit. Lediglich die für das aBS typische Kombination aus Hyperkalzurie, Nephrokalzinose und Osteopenie tritt beim BSND nicht konstant auf. Ein Patient, bei dem BSND molekulargenetisch gesichert wurde, ist in der Literatur beschrieben, der an Innenohrtaubheit litt, ansonsten aber nur eine sehr milde Symptomatik zeigte. [Landau et al. 1995, Miyamura et al. 2003, Shalev et al. 2003]

Therapie: Indometacin führt auch beim BSND zu einer Symptomlinderung, allerdings ist der Effekt weniger ausgeprägt als bei den anderen Varianten des BS. [Jeck et al. 2001]

Pathogenese: Mutationen im für die β -Untereinheit Barttin der Chloridkanäle CIC-Ka und CIC-Kb kodierenden Gen *BSND* wurden als Ursache des aBS mit sensoneuraler Taubheit identifiziert. Barttin ist essentiell für den Einbau der genannten Chloridkanäle in die Zellmembran. Wenige Jahre später wurde erstmals ein BSND-Patient mit einer homozygoten Missense-Mutation des für CIC-Ka kodierenden Gens *CLCNKA*, sowie einer homozygoten Deletion des für

ClC-Kb kodierenden Gens *CLCNKB* beschrieben. Hiermit ergaben sich starke Hinweise darauf, dass tatsächlich der funktionelle Verlust der genannten Chloridkanäle beim BSND ursächlich für die beschriebene Symptomatik ist. Eine Unterteilung des BSND in die Subtypen Bartter IVa und IVb erfolgt anhand des betroffenen Genproduktes Barttin (IVa), bzw. ClC-Ka und -Kb (IVb). Eine BSND-Patientin mit zwei jeweils heterozygoten Mutationen von *CLCNKA* und *CLCNKB* wurde 2008 beschrieben und als Bartter IVb klassifiziert. [Birkenhager et al. 2001, Schlingmann et al. 2004, Nozu et al. 2008] Der renale Salzverlust erklärt sich durch den Ausfall von ClC-Ka und -Kb ähnlich wie beim kBS, vgl. 1.2.1.; die Taubheit erklärt sich durch die sekundären Hemmung des NKCC1 durch den Wegfall der Rezirkulation des Cl^- und die somit fehlende K^+ -Aufnahme in Marginalzelle und Endolymphe, vgl. 1.4 und dort Abb. 1.7.

1.2.4. Gitelman-Syndrom (GS, OMIM ID #263800) EAST-Syndrom (GS-ähnlich, MIM-ID #612780)

Klinik: Das Gitelman-Syndrom (GS) manifestiert sich wie das klassische BS mit einer hypokaliämischen Alkalose, die Patienten haben aber im Gegensatz zum klassischen BS eine Hypokalzurie und Hypomagnesiämie. Die niedrigen Serumspiegel von K^+ und Mg^{2+} gehen mit einem entsprechenden renalen Verlust einher; zudem ist die renale Kalzium-Ausscheidung bei normalem Serum-Kalzium deutlich erniedrigt. Ca. die Hälfte der Patienten mit GS haben eine verlängerte QTc, die aber nur in Ausnahmefällen zu einer klinischen Symptomatik mit (prä-)synkopalen Zuständen führt. Heterozygote Träger einer Mutation des *SLC12A3* haben keine signifikanten Veränderungen der Serum-Elektrolyte oder deren Ausscheidung, wohl aber signifikant niedrigere Blutdrücke als die Kontrollgruppe. [Gitelman et al. 1966, Zarraga Larondo et al. 1992, Simon et al. 1996 (1), Pachulski et al. 2005, Fava et al. 2008]

Eine Sonderform einer Tubulopathie mit Gitelman-Syndrom-ähnlicher Symptomatik und zusätzlich Krampfanfällen, Innenohr-Taubheit und Ataxie stellt das EAST-Syndrom dar. [Bockenbauer et al. 2009, Scholl et al. 2009]

Therapie: Aufgrund des häufig milden Phänotyps genügt oftmals eine Supplementation mit Kalium und Magnesium. Ggf. führt eine Gabe von Kalium-sparenden Diuretika zu einer Symptomlinderung. Bei symptomatischen EKG-Veränderungen müssen in seltenen Fällen zusätzlich Antiarrhythmika verabreicht werden. [Pachulski et al. 2005, Knoers und Levchenko 2008]

Pathogenese: Der heterozygote Funktionsverlust des von *SLC12A3* kodierten Thiazid-sensitiven NCCT führt zum Phänotyp des Gitelman-Syndroms, vgl. Abb. 1.4. Bei einem großen Teil der untersuchten Patienten findet sich ein compound-heterozygoter Status, das heißt, diese Patienten tragen zwei verschiedene pathologisch mutierte Allele. Zudem wurden einzelne Patienten berichtet, die Mutationen des *CLCNKB* trugen und initial auch klinische Zeichen des klassischen BSs zeigten, im Verlauf der folgenden Jahre dann aber den milderen Gitelman-Phänotyp präsentierten. [Simon et al. 1996 (1), Jeck et al. 2000]

Die Symptomatik des EAST-Syndroms kann auf Mutationen des für den einwärts-gleichrichtenden K^+ -Kanal $K_{ir4.1}$ kodierenden Gens *KCNJ10* zurückgeführt werden. [Bockenhauer et al. 2009, Scholl et al. 2009] Pathogenetisch ist hier die fehlende K^+ -Rezirkulation und in der Folge die Hemmung der Na^+ - K^+ -ATPase und somit der Salz-Reabsorption über NCCT, vgl. Abb. 1.4.

1.3. Chloridkanäle der ClC-Superfamilie

Für die Erkrankung der unter 1.6.1. beschriebenen Patientin ist ein Verständnis der Chloridkanäle ClC-Ka und -Kb aus der ClC-Superfamilie von besonderer Bedeutung, so dass auf diese im Folgenden gesondert eingegangen werden soll. Bei den Chloridkanälen der ClC-Superfamilie handelt es sich um Ionenkanäle, die aus jeweils zehn bis zwölf Transmembran-Domänen bestehen

und mit diesen eine einzelne zentrale Pore bilden. Wegen der grundlegenden Bedeutung von Ionentransport für das Leben überrascht es wenig, dass strukturelle Homologe bis hinunter zu Prokaryoten existieren. Beim Menschen sind sie verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials z.B. in Skelettmuskel (CIC-1 [Koch et al. 1992]) oder Neuronen (CIC-2 [Haug et al. 2003]), sowie renale Transportprozesse (CIC-5 [Fisher et al. 1994], CIC-Ka und -Kb [siehe 1.3.1 bzw. 1.3.2]).

1.3.1. CIC-Ka (NCBI RefSeq NP_004061.3 und NP_001036169.1, NCBI GeneID 1187)

Für CIC-Ka existieren zwei Isoformen, die aus 687 bzw. 686 Aminosäuren bestehen. Das funktionelle Protein besteht aus jeweils zwölf Transmembran-Domänen, die eine zentrale Pore bilden. Beim Einbau in die Zellmembran bildet es ein Homodimer, das für seine Verankerung die Untereinheit Barttin (siehe 1.2.3.) benötigt. Das für CIC-Ka kodierende Gen, *CLCNKA*, liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p36) in direkter Nachbarschaft zu *CLCNKB*, dem für CIC-Kb kodierenden Gen. Es existiert eine enge strukturelle Homologie zu entsprechenden Proteinen bei *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* (jeweils 81%), sowie *Pan troglodytes* (97%). Hohe Expressionslevel von CIC-Ka werden neben der Niere und dem Innenohr lediglich noch in der Schilddrüse beobachtet. Eine monogene humane Erkrankung, die ausschließlich auf einem defekten CIC-Ka beruht, wurde bisher nicht beschrieben, eine knock-out-Maus mit Verlust des

homologen Kanals zeigt den Phänotyp eines renalen Diabetes insipidus [Matsumara et al. 1999]; Mutationen des humanen *CLCNKA* sind an der Entstehung vom Bartter Syndrom Typ IVb beteiligt (siehe 1.2.3.).

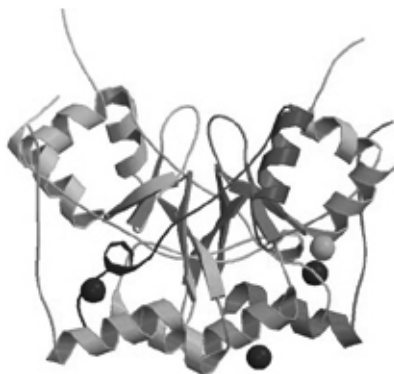


Abbildung 1.6:
Transmembran-Topologie von CIC-Ka.

1.3.2. CIC-Kb (NCBI RefSeq NP_000076.2 und NP_001159417.1, NCBI GeneID 1188)

Für CIC-Kb existieren ebenfalls zwei Isoformen zu 687 bzw. 518 Aminosäuren bestehen. Das funktionelle Protein besteht aus zwölf Transmembran-Domänen, die eine zentrale Pore bilden. Beim Einbau in die Zellmembran bildet es ein Homodimer, das für seine Verankerung die Untereinheit Barttin (siehe 1.2.3.) benötigt. Das für CIC-Kb kodierende Gen, *CLCNKB*, liegt direkt downstream von *CLCNKA* auf Chromosom 1p36. Die strukturelle Homologie zu entsprechenden Proteinen bei *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* beträgt jeweils 82%, sowie 87% bei *Canis lupus familiaris*. Hohe Expressionslevel von CIC-Kb werden ebenfalls in Niere, Innenohr und Schilddrüse beobachtet. Ein Defekt von CIC-Kb kann zum Phänotyp des Bartter Syndroms Typ III führen (siehe 1.2.1), außerdem sind Mutationen von *CLCNKB* am Bartter Syndrom Typ IVb beteiligt (siehe 1.2.3.).

1.4. Elektrolyttransport im Innenohr

[Ashcroft 2000, Guyton und Hall 2005]

Aufgrund der mit den Subtypen Bartter IVa und IVb einhergehenden Innenohr-Taubheit soll an dieser Stelle kurz auf den Elektrolyttransport, insbesondere den Chloridtransport, im Innenohr eingegangen werden.

Das Innenohr ist ein komplex aufgebautes Organ, das zum einen für die Schallempfindung, also die Übersetzung der durch Schall bedingten mechanischen Schwingungen in elektrische Signale in der Chochlea, verantwortlich ist. Zum anderen wird im Vestibularorgan durch Kopfbewegungen bedingte Flüssigkeitsbewegung in elektrische Signale übersetzt.

Voraussetzung für beide Prozesse ist die Generierung und Aufrechterhaltung eines elektrischen Gradienten zwischen der Endolymphe und dem umgebenden Gewebe. Dieser wird durch eine im Vergleich zum Plasma vierzigfach erhöhte K^+ -Konzentration in der Endolymphe erreicht [Lang et al. 2007]. Über durch mechanische Reizung aktivierte Ionenkanäle erfolgt ein K^+ -Einstrom aus der Endolymphe in die Haarzellen und somit die Generierung eines elektrischen Signals – welcher Kanal für diesen K^+ -Einstrom verantwortlich ist, ist bisher nicht abschließend geklärt [Corey 2006].

Die Verbindung renaler Erkrankungen mit Innenohr-Funktionsstörungen wirkt intuitiv nicht offensichtlich, wird aber klarer, wenn man die molekularen Transportmechanismen betrachtet, die an dem oben beschriebenen elektrochemischen Gradienten beteiligt sind. Die Ionentransporter im Innenohr und der Niere sind nämlich strukturell eng verwandt (z.B. NKCC1 im Innenohr und NKCC2 in der Niere) oder identisch (z.B. ClC-Ka, -Kb und Barttin).

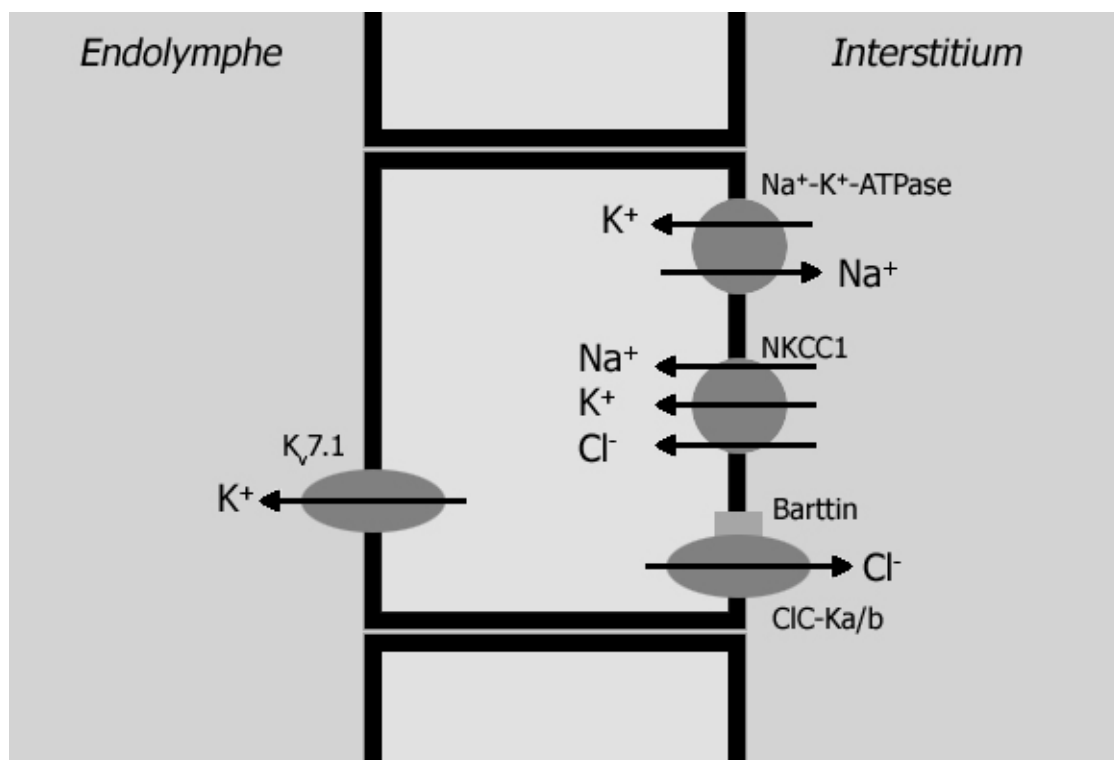


Abbildung 1.7: schematische Darstellung einiger Transportmechanismen in der Stria vascularis des Innenohrs

Wie bereits erwähnt, ist die Voraussetzung für die Schallempfindung ein gegen ein Konzentrations- und elektrochemisches Gefälle gerichteter Transport von K^+ aus dem Interstitium der Stria vascularis durch die Marginalzellen in die Endolymphe. K^+ wird aus dem Interstitium via NKCC1 mit einem Na^+ und zwei Cl^- aufgenommen. Energielieferant ist erneut eine $Na^+-K^+-ATPase$, über die ein weiteres K^+ gegen ein Na^+ ausgetauscht wird. Cl^- rezirkuliert über $ClC-Ka$ und $-Kb$ in das Interstitium und K^+ verlässt die Marginalzelle via $K_v7.1$ in die Endolymphe. Durch Mutation von Barttin kann der Einbau von $ClC-Ka$ und $-Kb$ behindert werden, also Cl^- nicht rezirkulieren und somit die Aufnahme von K^+ in die Marginalzellen und letztlich in die Endolymphe verhindert werden, wodurch die Innenohrtaubheit bei diesen Mutationen erklärt werden kann.

1.5. eukaryote Genexpression

[Guyton und Hall 2005]

Die Genexpression, also der Prozess, durch den die in den Genen gespeicherte Information in ein (im Falle eines nicht pathologisch mutierten Gens üblicherweise) funktionsfähiges Genprodukt, umgewandelt wird, ist Grundlage allen bekannten Lebens. Dieser Prozess ähnelt sich bei allen bekannten Lebensformen und verläuft bei Eukaryoten schrittweise von der Transkription bis zum Transport des fertigen Proteins wie folgt (auf die Genexpression von Prokaryoten und Viren, sowie die Prozessierung von Geninformation zu funktioneller RNS beim Eukaryoten soll im Rahmen dieser Einführung nicht eingegangen werden):

(a) Transkription (siehe auch 1.5.1.): die in der Desoxyribonukleinsäure (DNS) gespeicherte Information wird durch die RNS-Polymerase auf einen RNS-Einzelstrang kopiert. Dafür wird zunächst ein Prä-Initiationskomplex gebildet, der in der Promotorregion (siehe hierzu auch 1.5.2.) *upstream* des ersten Exons bindet. Zu diesem Komplex gehört der Kernpromotor, Transkriptionsfaktoren

(siehe auch 1.5.1.), die DNS-Helikase, die die Doppelstruktur der DNS zeitweise auflöst, sowie die RNS-Polymerase, deren Bindung an den DNS-Einzelstrang von der Anwesenheit der Transkriptionsfaktoren abhängig ist und die die Umschreibung von DNS in RNS vermittelt. Die RNS-Polymerase bewegt sich nun entlang des nicht-kodierenden Strangs der DNS von dessen 3'- zum 5'-Ende und erzeugt durch Paarung der RNS-Basen mit den DNS-Basen des nicht-kodierenden Strangs eine exakte Kopie des kodierenden DNS-Strangs (in identischer 5'-3'-Ausrichtung), wobei lediglich jeweils die Thyminе der DNS durch Uracile in der RNS ersetzt werden.

Da die Regulierung der Transkription wesentlich für die vorliegende Arbeit ist, wird hierauf unter 1.5.1. ausführlicher eingegangen.

(b) posttranskriptionale RNS-Modifizierung: vor der Übersetzung der nun in der RNS kodierten Information in eine Aminosäuresequenz wird die RNS für den Export aus dem Zellkern in das Zytosol stabilisiert; zum einen geschieht dies durch sogenanntes *Capping*, bei dem ein 7-Methyl-Guanins über eine 5'5'-Phosphodiesterbindung an das 5'-Ende der RNS gebunden wird, zum Anderen mittels Polyadenylierung, also dem Anheften von bis zu einigen Hundert Adenosin-Molekülen, des 3'-Endes der RNS. Beim *Splicing* werden schließlich die nicht-kodierenden Introne aus dem RNS-Transkript entfernt.

(c) Translation: nach Exportierung der modifizierten RNS in das Zytosol beginnt dort die Übersetzung der RNS-Sequenz in eine Aminosäure-Sequenz. Bei der von der oben beschriebenen *Cap* abhängigen Translation binden sogenannte Initiationsfaktoren, sowie die kleine (40S) Ribosomen-Untereinheit das 5'-Ende der RNS und bilden den Prä-Initiationskomplex. Dieser wandert auf der RNS zu deren 3'-Ende bis das Start-Codon erkannt wird. An dieser Stelle dissoziieren einige Initiationsfaktoren von der 40S-Untereinheit, so dass die große (60S) Ribosomen-Untereinheit binden kann. Durch das komplette (80S) Ribosom wird nun die RNS-Sequenz zwischen Start- und Stop-Codon vom 5'- zum 3'-Ende übersetzt.

(d) Proteinfaltung: die Funktion eines Proteins hängt wesentlich von seiner dreidimensionalen Struktur ab. Direkt nach der Translation besteht das Genprodukt zunächst aus einer zufällig geformten Aminosäuresequenz, deren durch die RNS vorgegebene Sequenz die *Primärstruktur* bildet. Die *Sekundärstruktur* wird durch Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen CO- und NH-Gruppen der einzelnen Aminosäuren bestimmt, während die Tertiärstruktur, also der übergeordnete räumliche Aufbau des Moleküls, im Wesentlichen davon bestimmt wird, dass hydrophobe Strukturen im Inneren des Proteins lokalisiert werden und hydrophile Anteile nach Außen gewandt sind. Diese Konformation wird durch Disulfidbrücken, Ionenbindungen und Wasserstoffbrücken-Bindungen stabilisiert. Die Ausbildung der Tertiärstruktur ist neben der formbestimmenden Aminosäuresequenz von äußeren Faktoren, wie der Temperatur, dem Lösungsmittel, sowie der Anwesenheit von assistierenden Proteinen, den *Chaperonen*, abhängig.

1.5.1. Regulation der Transkription

Die Regulation der Transkription von DNS zu RNS kann auf drei verschiedene Arten erfolgen: durch direkte Interaktion mit der DNS, durch Modulation der Transkription, sowie durch epigenetische (also nicht die DNS-Sequenz betreffende) Änderungen der DNS-Struktur:

(a) Interaktion mit der DNS: durch direkte Interaktion mit DNS-Bindungsstellen können Proteine die Bindung der RNS-Polymerase, bzw. des (Prä-)Initiationskomplexes unterstützen oder behindern und somit die Expression des nachfolgenden Genes herauf bzw. herunter 'regulieren.

(b) Modulation der Transkription: ist der (Prä-)Initiationskomplex gebildet, kann die Effektivität seiner Transkription durch unterstützende oder hemmende Kofaktoren moduliert werden.

(c) epigenetische DNS-Modifikation: chemische Veränderungen an der Struktur der DNS, die nicht deren Sequenz betreffen, hier insbesondere die DNS-Methylierung, können zu einer erschwerten Zugänglichkeit bestimmter DNS-Abschnitte führen und somit die Expression der hier kodierten Gene reduzieren.

1.5.1.1. Transkriptionsfaktoren

Bei den Transkriptionsfaktoren (TFen) handelt es sich um eine Klasse von Proteinen, die durch Bindung an für den TF spezifische DNS-Sequenzen die Transkription von DNS in RNS – und somit den ersten Schritt der Expression vom Gen zum Protein – kontrollieren. Dabei kann ein TF allein oder im Komplex mit anderen Proteinen agieren und die Transkription eines Gens sowohl befördern, als auch hemmen, bzw. überhaupt erst ermöglichen. [Latchman 1997, Lee und Young 2000]

Funktionell kann man zwei Klassen von Transkriptionsfaktoren unterscheiden. Zum einen werden bei Eukaryoten die basalen TFe (bTF) für die Transkription jedes Protein-kodierenden Gens benötigt. Diese vermittelt im Initiationskomplex die Bindung der RNS-Polymerase und der DNS. Ohne die bTF kann eine Transkription nicht stattfinden, eine Regulation der Genexpression erfolgt durch sie jedoch nicht. [Lee und Young 2000]

Die zweite Gruppe von TFe reguliert die Expression von Genen. Dafür binden diese TFe an DNS-Motive *upstream* des von ihnen regulierten Gens im sogenannten Promotor (siehe auch 1.5.1.2.). Ob durch den TF eine vermehrte oder verminderte Genexpression vermittelt wird, hängt von der Art des TFs ab. Dies geschieht primär über die Beeinflussung der Bindung der RNS-Polymerase oder den Acetylungsgrad von Histonen, bzw. sekundär über Kofaktoren, die ihrerseits mit der RNS-Polymerase bzw. Histonen interagieren. [Xu et al. 1999, Gill 2001, Narlikar et al. 2002]

Die Kontrolle der Genexpression auf Transkriptionsebene spielt eine wesentliche Rolle in der Entwicklung komplexer Organismen [Lobe 1992], sowie in der Kontrolle des Zellzyklus (und somit auch der Kanzerogenese) [Evan et al. 1994, Meyyappan et al. 1996]. Die Regulation der Transkription via TFen kann aber auch als Antwort auf Änderungen des intra- und extrazellulären Milieus, wie am Beispiel der Hypoxie kürzlich gezeigt, erfolgen [Benizri et al. 2008].

TFen bestehen aus mindestens zwei strukturellen Einheiten. Beginnend am N-Terminus der Aminosäuresequenz ist dies die DNS-bindende Domäne (DBD), die spezifische DNS-Sequenzen erkennt und an diese bindet. Anhand der Struktur der DBD können die TFen in Familien eingeteilt werden, innerhalb derer eine unterschiedliche Variabilität bezüglich der erkannten DNS-Sequenz besteht (Tabelle). [Latchman 1997]

Struktur der DNS-bindenden Domäne	Beispiel-TF	erkannte DNS-Sequenz
basic helix-loop-helix	Tal1	CA(A/C/G/T) ₂ TG [Murre et al. 1989]
basic leucine-zipper	AP-1 [Hess 2004]	TGA(G/C)TCA
MADS-box	SRF [Norman et al. 1988]	CC(A/T) ₆ GG
nuclear factor I	NFIA	TTGGC(A/C/G/T) ₅ GCCAA [de Vries et al. 1987]
paired box	Pax-1 [Chalepakakis 1991]	GTTCC
POU-Familie	Oct-1 [Petryniak 1990]	ATTTGCAT
winged-helix	FoxM1 [Korver et al. 1997]	TAAACA

Tabelle 1.2: Beispiele für TF-Familien, TFen und die von ihnen erkannten DNS-Sequenzen.

Die fakultative Signal-sensitive Domäne (SSD), sowie die Trans-aktivierende Domäne (TAD) können über eine Interaktion mit weiteren regulierenden Faktoren die Aktivität des TFs beeinflussen.

1.5.1.2. Promotoren

Wie bereits beschreiben handelt es sich bei Promotoren um DNS-Regionen, an denen die Transkription von Genen regulierende Faktoren gebunden werden können. Sie finden sich *upstream* (also in 5'-Richtung aus Sicht des kodierenden Strangs) des von ihnen regulierten Gens und bestehen aus verschiedenen Elementen.

Der Kernpromotor findet sich ca. 34 Basenpaare (bp) *upstream* des Start-Codons. Hier bindet der (Prä-)Initiationskomplex, somit ist der Kernpromotor (zumindest beim Eukaryoten) essentiell für den Beginn der Transkription und der einzig essentielle Bestandteil eines Promotors.

Der proximalen Promotor, bis ca. 250 bp *upstream*, bindet die wesentlichen regulatorischen Elemente und spezifische Transkriptionsfaktoren.

Der distale Promotor liegt – bis zu einige tausend bp – *upstream* des proximalen Promotors und bindet wiederum spezifische Transkriptionsfaktoren, hat aber in der Regel einen geringeren Einfluss auf die Genexpression.

Verschiedene Erkrankungen wurden bereits mit Promotor-Mutationen in Verbindung gebracht. Diese Mutationen können dabei sowohl den proximalen (z.B. Thalassämie [Kulozik et al. 1991]), als auch (z.B. Asthma [Burchard et al. 1999]) betreffen.

1.6. Hintergrund und Fragestellung dieser Arbeit

Angeborene Salzverlusterkrankungen der Niere sind seltene, jedoch potentiell vital bedrohliche Erkrankungen, deren rechtzeitige Diagnose und Therapie das Überleben der betroffenen Kinder sichert. Dies setzt eine genaue Kenntnis der verschiedenen Varianten des Bartter Syndroms zugrunde liegenden genetischen Defekte voraus. Leider ist eine definitive molekularbiologische Diagnose noch immer nicht bei allen Patienten möglich, die typische klinische Zeichen des Bartter Syndroms aufweisen. Dies liegt im Wesentlichen in der genetischen Heterogenität des Bartter-Syndroms begründet, wie zuletzt sehr eindrücklich durch die Beschreibung zweier Patienten mit der neuesten Variante, Bartter Typ IVb, aufgezeigt wurde. Der folgende Fallbericht stellt eine weitere Patientin vor, bei der der klinische Phänotyp nicht mit dem zu erwartenden Genotyp korreliert werden konnte.

1.6.1. Fallbericht

Es handelt sich um eine 1988 geborene Patientin, erste Tochter entfernt verwandter türkischer Eltern. Der genaue Grad der Verwandtschaft konnte nicht sicher angegeben werden, liegt aber wohl sicher jenseits der Konstellation Cousin/Cousine ersten Grades. Der Schwangerschaftsverlauf gestaltete sich zunächst komplikationslos, über die Fruchtwassermenge lagen keine Angaben vor. Nach 27 vollendeten SSW kam es zu einem vorzeitigen Blasensprung und rasch nachfolgend zur Geburt des Kindes. Das Geburtsgewicht lag bei 920 g (40. Perzentile), die postnatale Anpassung war mit einem APGAR-Score von 9/6/7 Punkten nach 1/5/10 Minuten altersentsprechend zufriedenstellend. In der ersten postnatalen Woche entwickelte die Patientin ein Nierenversagen mit einem Rückgang der Diurese und ansteigenden Retentionsparametern. Dies wurde zunächst auf einen hämodynamisch relevanten PDA zurückgeführt, der in der dritten Lebenswoche operativ verschlossen wurde. Im weiteren Verlauf kam es nur zu einer marginalen Besserung der Nierenfunktion, für eine

adäquate Diurese wurden weiterhin Schleifendiuretika benötigt. Im Alter von fünf Monaten manifestierte sich zunehmend eine Hypokaliämie (knappe Normalisierung unter zusätzlicher enteraler Kalium-Gabe von täglich 5 mmol pro kg Körpergewicht) bei nunmehr präterminaler Niereninsuffizienz (Kreatinin-Clearance 22 Milliliter pro Minute und 1,73 m² Körperoberfläche). Im Ultraschall fand man einen Verlust der Mark-Rinden-Differenzierung und eine diffuse Echogenitäts-Vermehrung ohne typische Zeichen der Nephrokalzinose. Die renale Ausscheidung von Kalium und Kalzium war normwertig, die von Natrium deutlich erhöht. Zudem wurde eine erhöhte renale Ausscheidung von Prostaglandinen nachgewiesen und dementsprechend die Diagnose eines aBS gestellt. Eine Besserung des klinischen Zustandes konnte im Verlauf durch eine Indometacin-Therapie, sowie die orale Substitution von Kalium erreicht werden. Im Alter von zwei Jahren wurde mittels BERA eine bilaterale sensoneurale Taubheit nachgewiesen. Somit erschien anhand der Kombination typischer klinischer Symptome die Diagnose BSND (Bartter Typ IV) naheliegend.

Trotz der zunehmenden Aufklärung der genetischen Ursachen der unterschiedlichen Varianten des Bartter Syndroms und in 2001 auch des BSND konnte die klinische Diagnose BSND bei der hier beschriebenen Patientin nicht molekularbiologisch bestätigt werden. Insbesondere fand sich auch ein unauffälliger Wildtyp des *BSND*-Gens.

1.6.2. offene Fragestellungen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die genetische Grundlage für die klinischen Symptome der unter 1.6.1. beschriebenen Patientin aufzudecken. Dafür wurde an den Genloki der für alle Bartter Varianten bekannten Gene eine Haplotypen-Analyse durchgeführt. Die Blutsverwandtschaft der Eltern legte eine Homozygotie des betroffenen Gens – im Gegensatz zum gleichzeitigen, heterozygoten Zusammentreffen zweier unterschiedlicher Mutationen – nahe. Nach Sequenzierung des Kandidatengens sollte im Falle des Nachweises eines Gendefektes eine funktionelle Charakterisierung des kodierten Proteins

erfolgen. Da sich bei der beschriebenen Patientin letztlich eine Deletion eines Gens, sowie eine Promotor-Mutation eines zweiten Gens nachweisen ließ, erfolgte die Charakterisierung des DNS-Defektes mittels eines Assays zum Nachweis des Einflusses der Mutation auf die Expression des nachfolgenden Gens.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Reagenzien

Anwendungsgebiet	Bezeichnung	Bezugsquelle
Standard-Chemikalien (soweit nicht anders erwähnt)		Sigma-Aldrich, Steinheim oder C. Roth, Karlsruhe
purifiziertes und deionisiertes Wasser	aus Leitungswasser via MilliQ-Anlage	Millipore, Billercia, MA, USA
Präparation genomischer DNS	illustra blood genomicPrep Midi Flow Kit	GE Healthcare Life Science, Uppsala, Schweden
Oligonukleotide	z.B. PCR-Primer	Invitrogen Deutschland, Darmstadt
Mikrosatelliten-Analyse	ALFexpress Autoreading Kit	GE Healthcare Life Science, Uppsala, Schweden
Mikrosatelliten-Analyse	Sizer	GE Healthcare Life Science, Uppsala, Schweden
Mikrosatelliten-Analyse	ReproGel-Fertiggel	GE Healthcare Life Science, Uppsala, Schweden
Mutagenese	QuickChange Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Plasmid-Aufreinigung	Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Sequenzierung	ABIPrism DigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Kit	Perkin Elmer, Witham, MA, USA
Klonierung	TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen Deutschland, Darmstadt

Tabelle 2.1: Auflistung der Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien sortiert nach Anwendungsgebiet (Fortsetzung auf der folgenden Seite).

Anwendungsgebiet	Bezeichnung	Bezugsquelle
Transfektion	TransFast Kit	Promega, Fitchburg, WI, USA
funktionelle Promotor- Untersuchungen	DualGlo Luciferase Assay System	Promega, Fitchburg, WI, USA
funktionelle Promotor- Untersuchungen	pRL-SV40- und pGL3-Vektoren	Promega, Fitchburg, WI, USA

Tabelle 2.1 (Forts.): Auflistung der Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien sortiert nach Anwendungsgebiet.

2.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerätschaft	Bezeichnung	Bezugsquelle
DNS-Elektrophorese -Analyzer	ALF express	GE Healthcare Life Science, Uppsala, Schweden
Gelkammer	Owl B1A Easy Cast	Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA
Gewebekulturplatten	24-Loch "Costar"	Corning Inc., Corning, NY, USA
Heizblock	TM 130-6	Heap Labor Consult, Bovenden
Kühlzentrifuge	Biofuge fresco	Hereus Thermo Electron, Osterode
Luminometer	Lumat LB9507	Berthold Technologies, Bad Wildbach
Magnetrührer	RCT-basic	IKA Werke, Staufen
pH-Meter	MP 220	Mettler Toledo, Spanien
Pipettenspitzen	RNAse-frei, 1; 5; 200; 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Schüttler	Yello-Line OS 5 basic	IKA Werke, Staufen
Sequenzierer	ABI Prism 310	Perkin Elmer, Witham, MA, USA

Tabelle 2.2: Auflistung der Bezugsquellen der verwendeten Geräte sortiert nach deren Bezeichnung (Fortsetzung auf der folgenden Seite).

Gerätschaft	Bezeichnung	Bezugsquelle
Spectrophotometer	Ultospec 2100 pro	GE Healthcare Life Science, Uppsala, Schweden
sterile Probenröhrchen, groß (Falcon)	15 ml, 50 ml	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
sterile Probenröhrchen, klein (Eppendorf)	0.5 ml, 1.5 ml	Eppendorf, Hamburg
UV-Transluminator	TFX-20M	Fröbel Labortechnik Lindau
Vortex-Mixer	VM 300 neoLab 7-2020	Migge Heidelberg
Waage	Explorer Pro	Ohaus Corporation, Pine Brooks, NJ, USA

Tabelle 2.2 (Forts.): Auflistung der Bezugsquellen der verwendeten Geräte sortiert nach deren Bezeichnung.

2.3. Methodik

2.3.1. Präparation genomischer DNS

Je ca. 5 ml Vollblut der Patientin, sowie, für die unter 2.3.4. bis 2.3.8. beschriebenen Versuche, einer gesunden Vergleichsperson, wurden entnommen und mit einem *illustra blood genomicPrep MidiFlow Kit* gemäß den Angaben des Herstellers präpariert. Die so gewonnene DNS wurde aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation kurzer (bis zu wenige Tausend) Nukleotidsequenzen wurde die PCR angewandt [Saiki et al. 1985].

Die benötigten Substanzen wurden auf Eis aufgetaut und typischerweise wie folgt vermischt (bei Abweichungen siehe im laufenden Text): 10-fach PCR-Puffer (5 µl), 2 mM dNTP-Mix (5 µl), Primer "forward" und "reverse" (je 2 µl), DNA (500 ng), Taq-Polymerase (50 ng), steriles deionisiertes Wasser (auffüllen auf 50 µl). Nach kurzem Mischen im Vortex wurde, falls in Ausnahmefällen kein Thermocycler mit geheiztem Decken zur Verfügung stand, der Reaktionsansatz mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet.

Die Reaktion im Thermocycler begann mit einer dreiminütigen Denaturierung (wurde diese im Einzelfall verlängert, wurde die Taq-Polymerase erst nach diesem Schritt hinzu gegeben). Danach folgte eine je nach Reaktion verschieden häufige Wiederholung jeweils gleicher Zyklen von Denaturierung / Primer-Anlagerung / Extension (spezifische Programme sind ggf. im laufenden Text beschrieben), gefolgt von einer letzten fünfminütigen Extensionsphase.

2.3.3. Mikrosatelliten-Analyse

Um zu bestimmen, ob ein gegebener Abschnitt des Genoms hetero- oder homozygot vererbt wurde, wurde genomische DNS auf Mikrosatelliten, oder SSLPs (*simple sequence length polymorphisms*), untersucht. Hierbei handelt es sich um kurze nicht-kodierende DNS-Sequenzen, die sich an vielen Stellen im Genom in individuell unterschiedlichem Maß wiederholen. Durch PCR-Amplifikation mittels flankierender Markern und anschließende Elektrophorese kann die individuelle Länge dieser Sequenzen in der Nähe einzelner Gene bestimmt werden. Der Vergleich mit den elterlichen SSLPs lässt dann Rückschlüsse auf die Zygote des untersuchten Genabschnitts zu. [Queller et al. 1993]

Im ersten Schritt wurde mit je vier Primerpaaren eine PCR durchgeführt; folgende vorbeschriebene Marker wurden für die jeweiligen Gene verwendet:

<u>SL12A1</u>	D15S 161,	D15S 123,	D15S 992,	D15S 126
<u>KCNJ1</u>	D11S 934,	D11S 912,	D11S 4150,	D11S 4131
<u>CLCNKB</u>	D1S 507,	D1S 436,	D1S 2826,	D1S 2644
<u>BSND</u>	D1S 2661,	D1S 417,	D1S 475,	D1S 200

Das Fertiggel wurde unter einer UV-Lampe ausgehärtet, in das Analyse-Gerät (ALFexpress) eingesetzt und mit Laufpuffer (6% TBE 10x in purifiziertem deionisiertem Wasser) nach Herstellerangaben gespült.

Ein externer Standard und die zu analysierenden Proben wurden wie folgt vermischt:

<u>Externer Längenstandard</u>	Sizer 50-500 (3 µl), Loading-Dye (5 µl)
<u>Analyse-Proben</u>	Sizer* (je 1 µl), Loading-Dye (5 µl), PCR-Produkt (1 µl)

**je nach erwarteter Amplikon-Länge*

Nach fünfminütiger Denaturierung bei 95°C wurden die Proben wieder auf Eis gegeben und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Die Messung der Amplikonlängen erfolgte automatisiert durch den DNS-Elektrophorese-Analyzer.

2.3.4. Sequenzierung

Die Sequenzierungen verschiedener Genabschnitte der Patientin, sowie von Plasmiden wurde zum Teil im eigenen Labor durchgeführt, teils (in der Regel ab einer erwarteten Amplikon-Länge von über 700 Basen) erfolgte diese durch die Firma GATC Biotech AG, Konstanz.

Für die externe Sequenzierung wurden per PCR amplifizierte Sequenzen mit je 200 pmol der benötigten Primer in 20 µl purifiziertem und deionisiertem Wasser versendet. Im Folgenden findet sich das Protokoll für die interne Sequenzierung auf einem ABI Prism 310.

2.3.4.1. Vorbereitung der Sequenzierung

Mittels PCR wurden die zu sequenzierenden Sequenzen zunächst amplifiziert. Danach wurden folgende Substanzen für die Sequenzierung von DNS bzw. Plasmiden hinzu gefügt:

Eine erneute PCR wurde dann unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 25 Zyklen à [10 Sek. 94°C, 5 Sek. 50°C, 4 Min. 60°C].

Substanz	DNS	Plasmide
PCR-Produkt/ Plasmid	11 µl	1 µg
DMSO	0,5 µl	0,5 µl
5x Puffer	2 µl	2 µl
BigDye	2 µl	2 µl
Primer	1 µl	1 µl
purifiziertes Wasser	3,5 µl	ad 20 µl

Zu dem PCR-Produkt wurden pipettiert: purifiziertes Wasser (80 µl), 3M NaAcetat pH 4,8 (10 µl), absolutes Ethanol (250 µl) und das Gemisch bei 13.000 Umdrehungen pro Minuten für 20 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und nach Waschung mit Ethanol 80% (150 µl) erneut für 15 Minuten bei 13.000 Umdrehungen pro Minute unter Raumtemperatur zentrifugiert.

Nach erneutem Abpipettieren des Überstandes wurde das Probengefäß für zehn Minuten bei 37°C ausgetrocknet und anschließend in 20 µl *Template Suppression Reagent* aufgenommen. Die Probe wurde dann in ein Sequenziertube überführt, mit einem Septum bedeckt, für drei Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gelagert.

Die Tubes wurden dann in den Sequenzierer geladen und die Proben von diesem automatisiert analysiert.

2.3.4.2. Nachweis eines Fusionsfragmentes nach Deletion von *CLCNKB*

Zum Nachweis der Deletion von *CLCNKB* wurde die Fusion der benachbarten Genabschnitte nachgewiesen, wie von Simon et al. vorgeschrieben [Simon et al. 1997]. Dazu wurden zwei PCRs mit verschiedenen *downstream* gerichteten Primer (F1 und F2 in Abbildung 2.1) und jeweils mit dem gleichen upstream gerichteten Primer (R in Abbildung 2.1) durchgeführt. Die zu F1 und F2 komplementären Sequenzen liegen dabei am Ende des letzten Exons von *CLCNKA* bzw. *CLCNKB*, die zu R komplementäre Sequenz *downstream* des letzten Exons von *CLCNKB*.

Ist *CLCNKB* nicht deletiert können die Fragmente A (27.600 bp, Primer F1 und R) und B (4.300 bp, Primer F2 und R) entstehen. Nach Deletion von *CLCNKB* und Fusion der daneben gelegenen Genabschnitte entsteht Fragment C, bestehend aus den Teilen C.1 und C.2 (Fragmentlänge abhängig vom Umfang der Deletion, Primer F1 und R).

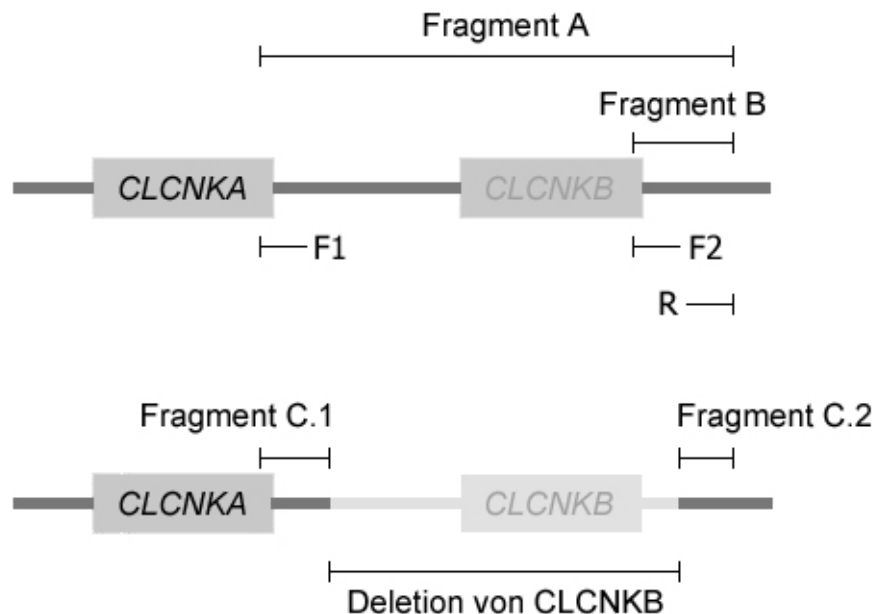


Abbildung 2.1: schematische Darstellung der Primer und der entstehenden Fragmente mit und ohne Deletion von *CLCNKB*.

2.3.4.3. Sequenzierung des Promotors von *CLCNKA*

Die verwendeten Primer, sowie die Längen der erwarteten Fragmente waren die folgenden. Die Positionsangaben beziehen sich auf die *CLCNKA* und seinen Promotor umfassende Sequenz AL355994:

Fragment A:

forward	GGGCACTGTTCTAGCTCTGAAGGA	(51498 - 51523)
reverse	GAAATGCTTCTCAAAGCACAC	(52455 - 52435)
Länge	957 Basen	

<u>Fragment B:</u>	forward	GGACTTGAGCTGCAGATGTGA	(52272 - 52292)
	reverse	ATGCACACAGCAGGACAGAG	(52960 - 52941)
	Länge	688 Basen	
<u>Fragment C:</u>	forward	CCCCCTGCCTTCTCCTTCCCTTC	(52822 - 52843)
	reverse	CAGTCCTCCTGCTGCGGCTGAAC	(53287 - 53265)
	Länge	465 Basen	
<u>Fragment D:</u>	forward	GGTTGGTTTGTCAAGGACGT	(53113 - 53132)
	reverse	ATGTCCTCAGTGGTCCCCCGC	(53995 - 53975)
	Länge	882 Basen	

2.3.5. Klonierung

Aus der DNS der gesunden Kontrollperson wurde mit den Primern

forward	GGGCACTGTTCTAGCTCTGAAGGA	(51498 – 51523)	und
reverse	CGACTCTCCCTGCCAATCTCG	(53486 - 53466)	

ein knapp 2.000 bp langes Fragment des *CLCNKA*-Promotors amplifiziert; dabei geben die Zahlen in Klammern hinter den Primern wiederum die Position in AL355994 an.

Dieses Fragment wurde direkt mit dem *TOPO TA Cloning Kit* in einen TOPO-Vektor kloniert. Bei diesem Verfahren wird die Tatsache, dass an beiden Strängen des PCR-Produktes ein einzelnes Adenin am 3'-Ende überhängt, ausgenutzt, um mittels der Topoisomerase I aus *Vaccinia-Viren* dieses PCR-Produkt ohne weitere Vorbehandlung in den TOPO-Vektor zu klonieren.

Die Amplifikation der Vektoren erfolgte durch Kultur in *Epicurian-coli*-Bakterien. Dafür wurde ein Aliquot der Bakterien auf Eis aufgetaut und für zehn Minuten mit 1,7 µl β-Mercaptoethanol auf Eis inkubiert. Nach Hinzugabe von 50 ng der

zu transformierenden DNS folgte nach weiteren 30 Minuten auf Eis eine Erhitzung von zwei Minuten bei 42°C und anschließend eine erneute Lagerung auf Eis für weitere zwei Minuten. Die Bakterien-Suspension wurde dann in 250 µl vorgewärmtes LB-Nährmedium gegeben und für eine Stunde bei 37°C mit 250 Umdrehungen pro Minute gerüttelt. Danach wurden 20 µl der Suspension auf einer und der Rest der Suspension auf einer zweiten Agar-Platte ausgestrichen. Diese wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Morgen wurden einzelne Kolonien in jeweils 100 ml LB-Nährmedium überführt und für eine weitere Nacht bei 37°C und 250 Umdrehungen pro Minute inkubiert.

Die Extraktion und Aufreinigung der Vektoren erfolgte mit dem Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen.

Danach wurde die korrekte Orientierung des Promotors im Vektor, sowie seine fehlerfreie Sequenz per direkter Sequenzierung nachgewiesen (siehe 2.3.4.).

Anschließend wurde der Vektor mit den Restriktions-Endonukleasen *KpnI* und *XhoI* verdaut, die in der Nähe der Ligationsstellen des Promotors im TOPO-Vektor, nicht aber im Promotor selbst schneiden. Durch den Verdau des pGL3-Vektors mit den gleichen Enzymen wurden komplementäre Schnittstellen direkt vor der in diesem Vektor kodierten Photinus-Luciferase (Siehe auch 2.3.9.) geschaffen und anschließend das Promotor-Fragment eingefügt.

Erneut wurde dann die korrekte Sequenz und Orientierung des Promotors im Vektor durch direkte Sequenzierung nachgewiesen.

2.3.6. Mutagenese

Um die funktionelle Bedeutung einer Promotor-Mutation nachweisen zu können, wurde diese per Mutagenese in den unter 2.3.4. hergestellte (*CLCNKA*-Promotor)-pGL3-Vektor eingeführt. Dazu wurde das *QuickChange-Kit* der Firma

Agilent Technologies verwendet. Bei den für die Mutagenese notwendigen Primern handelte es sich um

forward CCAGGAGCCTGAGTACAGCTAGGCACCACCCTCTGTGCAGC
reverse GCTGCACAGAGGGTGGTGCCTAGCTGTACTCAGGCTCCTGG

Die PCR lief mit folgenden Einstellungen:

Denaturierung	30 Sekunden bei 95°C
Anlagerung / Elongation	18 Zyklen à [30 Sek. 95°C, 60 Sek. 55°C, 420 Sek. 68°C]
finale Elongation	360 Sek. 72°C

2.3.7. Zellkultur

Drei verschiedene Zelllinien wurden in Zellkultur gehalten und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Alle drei Zelllinien waren bereits seit mehreren Jahren im Forschungslabor etabliert und ursprünglich von einer kommerziellen Zellbank erworben worden. Es handelte sich dabei zum einen um die Zelllinie HEK, einer Standardzelllinie, die auf einer menschlichen embryonalen Nierenzelle basiert [Shein und Enders 1962]. Diese wurde in Dulbecco's modified Eagle's medium mit fetalem Kälberserum (10%), Streptomycin (50 µg/ml) und Penicillin (50 U/ml) kultiviert und alle drei Tage im Verhältnis 1:5 passagiert. Dabei wurden die Zellen nach Absaugen des Nährmediums mit 2 ml Trypsin-EDTA überschichtet, für fünf Minuten unter den Standardbedingungen inkubiert und dann mit 10 ml Nährmedium aufgenommen. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 900 Umdrehungen je Minuten wurde der Überstand erneut abgesaugt, das Zellpellet in Nährmedium aufgenommen und in frische Zellkultur-Flaschen überführt.

Bei der zweiten Zelllinie handelte es sich um MDCK, einer Zelllinie, die aus den Sammelrohren eines Hundes etabliert wurde [Gausch et al. 1966]. Diese wurden in MEM M2 Medium, ebenfalls mit fetalem Kälberserum (10%), Streptomycin (50 µg/ml) und Penicillin (50 U/ml), kultiviert. Die Passagierung erfolgte alle fünf bis sieben Tage, sobald der Boden der Kulturflasche zu 80 bis 90% von Zellen bedeckt war, im Verhältnis 1:3.

Die dritte Zelllinie, MDCT, war murinen Ursprungs und war aus Sammelrohrzellen etabliert worden. Diese wurde in Dulbecco's modified Eagle's medium mit fetalem Kälberserum (10%), Streptomycin (50 µg/ml) und Penicillin (50 U/ml) kultiviert und alle drei Tage im Verhältnis 1:5 passagiert.

Zur Vorbereitung der funktionellen Promotor-Untersuchungen (siehe unten) wurden je 3×10^4 HEK, bzw. MDCK in 24-Loch-Kulturplatten mit jeweils 3 ml Nährlösung unter obigen Bedingungen kultiviert.

2.3.8. Transfektion

Aus den Reagenzien *TransFast Kits* wurde eine Stammlösung je Loch der zu transfizierenden 24-Loch-Kulturplatten wie folgt hergestellt: DNS (für die exakte DNS-Menge siehe unter den jeweiligen Experimenten), serumfreies Medium (ad 200 µl), TransFastSolution (3 µl je µg eingesetzter DNS).

In jedes Loch der Kulturplatten wurden dann 200 µl der Stammlösung pipettiert und die Platen dann für eine Stunde unter den Standardbedingungen inkubiert.

Danach wurde je Loch 1 ml der serumhaltigen Nährlösung hinzu pipettiert und die Kulturplatten für weitere 48 Stunden inkubiert.

2.3.9. funktionelle Messungen der Promotor-Aktivität

Um die funktionelle Bedeutung einer Mutation im Promotor des *CLCNKA* zu untersuchen, wurde das *DualGlo Luciferase Assay System* der Firma Promega verwendet, das auf folgendem Prinzip basiert: DNS zweier biolumineszenter Organismen wurde parallel über Vektoren in Kulturzellen transfiziert. Die erste DNS wurde via dem Vektor pRL-SV40 (Abbildung 2.3) transfiziert und kodiert für das Schrittmacherenzym Luciferase der Biolumineszenz von *Renilla reniformis* (Abbildung 2.2), einer Koralle aus der Ordnung der Seefedern. Diese diente als interne Kontrolle der Transfektionseffizienz.

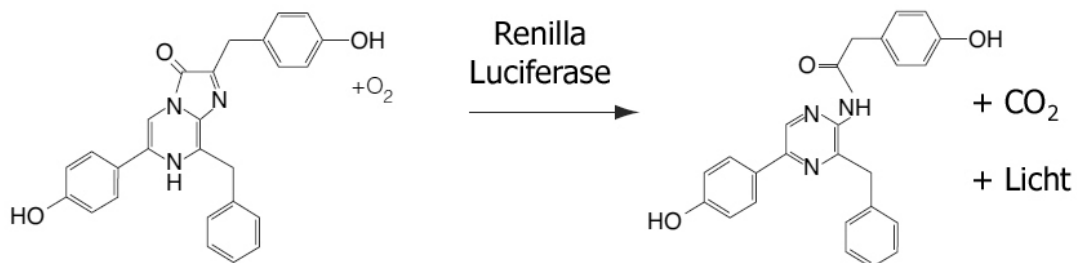


Abbildung 2.2: die chemische Reaktion hinter der Biolumineszenz von *Renilla reniformis*.

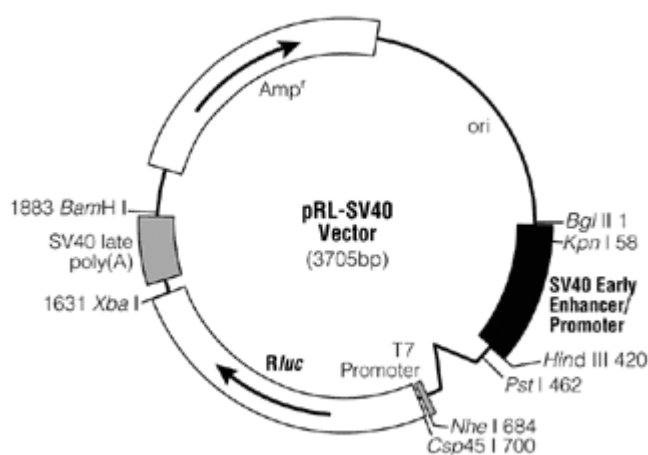


Abbildung 2.3: schematische Darstellung des für die Renilla-Luciferase kodierenden Vektors pRL-SV40

Die andere DNS kodiert für das Schrittmachereenzym Luciferase der Licht produzierenden Reaktion des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (Abbildung 2.4) und wurde in dem Vektor pGL3 (Abbildung 2.5) transfiziert. In diesem Vektor konnte vor die kodierenden Sequenz ein Promotor kloniert werden, so dass die Expressionsrate dieses Schrittmachereenzym abhängig von der Aktivität des hinein klonierten Promotors ist.

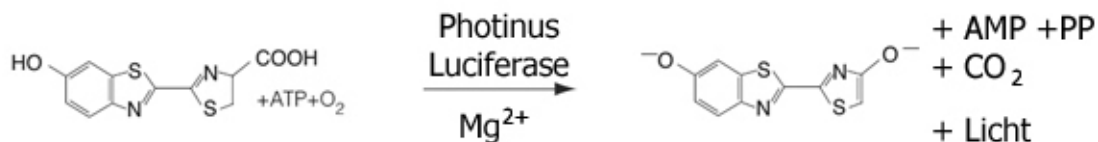


Abbildung 2.4: die chemische Reaktion hinter der Biolumineszenz von *Photinus pyralis*.

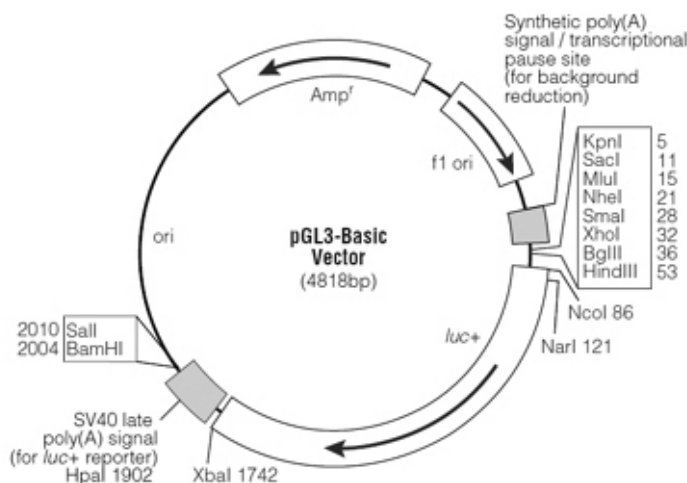


Abbildung 2.5: schematische Darstellung des für die *Photinus*-Luciferase kodierenden Vektors pGL3.

Die Transfektion der HEK- und MDCK- Zellkulturen erfolgte 24 Stunden nach deren Umsetzten in 24-Loch-Kulturplatten. Erste Experimente hatten gezeigt, dass die Transfektion identischer DNS-Mengen von pRL-SV40 und pGL3 zu einer relativ zu hohen Leuchtintensität (siehe unten) der Renilla-Luciferase führte, so dass in den folgenden Experimenten je Loch der 24-Loch-Kulturplatten bei den HEK-Zellen 20 ng pRL-SV40 und 500 ng pGL3, sowie bei den MDCK-Zellen 30 ng pRL-SV40 und 750 ng pGL3 transfiziert wurden.

Nach 48-stündiger Inkubation der transfizierten Zellen wurden diese geerntet, in 20 µl serumfreies Medium je Loch der Kulturplatten aufgenommen und in Probenröhrchen überführt. Im Folgenden wurde zunächst das Substrat der Renilla-Luciferase hinzu gegeben und die Leuchtintensität dieser Reaktion gemessen. Im zweiten Schritt wird zunächst diese Reaktion durch die Stop&Glo Reagenz unterdrückt und gleichzeitig das Substrat für die Photinus-Luciferase hinzugegeben, so dass die Leuchtintensität der zweiten Reaktion gemessen werden konnte.

Ausgewertet wurde für jedes Loch der Kulturplatten der Quotient aus der Intensität der Photinus-Reaktion (als Maß für die Aktivität des in pGL3 hinein geklonten Promotors) und der der Renilla-Reaktion (als interne Kontrolle der Effizienz der gleichzeitigen Transfektion von pGL3 und pRL-SV40).

2.3.10. statistische Auswertung

Zielparameter der statistischen Auswertung war die putative Abnahme der relativen Lumineszenz (gemessen als Quotient aus der Photinus- und der Renilla-Lumineszenz) nach Transfektion des G832A-Promotors im Vergleich zum Wildtyp. Die Signifikanz der Reduktion der relativen Lumineszenz wurde mit dem t-Test für zwei unabhängige Stichproben getestet. Mittelwerte, μ_P und μ_R , und Standardabweichungen, σ_P und σ_R , der Photinus- und Renilla-Lumineszenzen wurden aus den Rohdaten ($x_{P,1}, \dots, x_{P,n}, x_{R,1}, \dots, x_{R,n}$) berechnet, bzw. geschätzt.

$$\mu_P = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_{P,i} \quad \text{bzw.} \quad \mu_R = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_{R,i} \quad \text{und}$$

$$\sigma_P = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_{P,i} - \mu_P)^2} \quad \text{bzw.} \quad \sigma_R = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_{R,i} - \mu_R)^2} .$$

Der Mittelwert μ und die Standardabweichung σ des Quotienten aus Photinus- und Renilla-Lumineszenz wurden wie folgt berechnet:

$$\mu = \frac{\mu_P}{\mu_R} \quad \text{und} \quad \sigma = \mu \cdot \sqrt{\left(\frac{\sigma_P}{\mu_P}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_R}{\mu_R}\right)^2}.$$

3. Ergebnisse

3.1. Mikrosatelliten-Analyse

3.1.1. *SLC12A1*, *KCNJ1* und *BSND*

Bei den Mikrosatelliten-Analysen zeigten sich für *SLC12A1*, *KCNJ1* und *BSND* jeweils bei der Patientin und ihren Eltern Fragmente unterschiedlicher Länge, wobei jeweils eine Bande der Patientin der Mutter die andere dem Vater zugeordnet werden konnte.

Unter der Annahme, dass aufgrund der Blutsverwandtschaft der Eltern der Phänotyp der Patientin am ehesten durch eine homozygot vorliegende Mutation erklärlich wäre, erschien zu diesem Zeitpunkt eine Erkrankung der Patientin an den Bartter-Typen I, II und IVa unwahrscheinlich.

3.1.2. *CLCNKB*

Bei der Mikrosatelliten-Analyse des Genlokus von *CLCNKB* zeigte sich bei der Patientin nur eine Fragmentlänge, die auch bei beiden Eltern, dort jeweils zusammen mit einem weiteren Fragment, nachweisbar war, was darauf hindeutete, dass die Patientin für diesen Genlokus homozygot war. Aufgrund der Nähe der Genloki für *CLCNKB* und *CLCNKA* lässt sich bei diesen Ergebnissen und mittels dieser Methode eine Homozygotie auch für *CLCNKA* nicht ausschließen. Daher sollten im nächsten Schritt beide Gene (*CLCNKA* und *CLCNKB*) vollständig sequenziert werden.

3.2. Sequenzierungen und Fusionsfragment-Analyse

3.2.1 Sequenzierung von *BSND*

Aufgrund des typischen Phänotyps war bereits nach Publikation der genetischen Ursache des Bartter IVa [Birkenhager et al. 2001] im hiesigen Labor eine entsprechende Sequenzierung von *BSND* durchgeführt worden, die einen unauffälligen Genotyp ergab.

3.2.2. Sequenzierung und Fusionsfragment *CLCNKB*

Bei dem Versuch, *CLCNKB* zu sequenzieren, konnten in der PCR keine Amplifikate hergestellt werden. Da bekannt war, dass vollständige Deletionen von *CLCNKB* eine häufige Ursache des kBS sind [Simon et al. 1997, Konrad et al. 2000], wurde versucht ein entsprechendes Fusionsfragment für *CLCNKB* nachzuweisen.

Bei diesen Versuchen fand sich ein ca. 4.000 bp umfassende Fragment, das sowohl bei der Patientin, wie auch bei ihren Eltern, nicht aber bei einer gesunden Kontrollperson vorliegt und der Fusionsstelle nach Deletion von *CLCNKB* entspricht. Das zu erwartende über 25.000 bp umfassende Amplikon, das bei den Eltern und der gesunden Kontrollperson erwartet würde und den kompletten *CLCNKB* umfassen würde, konnte unter den gegebenen PCR-Bedingungen nicht amplifiziert werden. Somit war der Nachweis einer homozygoten Deletion des *CLCNKB* erbracht.

3.2.3. Sequenzierung *CLCNKA*

Die vollständigen Sequenzierung der Exone von *CLCNKA* verlief technisch problemlos und ergab keine über bekannte synonyme, also die Aminosäureabfolge des kodierten Proteins nicht verändernde, Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) hinaus-gehende Abweichungen vom Wildtyp.

Der schwere Phänotyp der Patientin war allein durch die Deletion von *CLCNKB* nicht hinreichend erklärt. Es wurde daher eine bisher unentdeckte Veränderung des *BSND* (die allein den Phänotyp erklären könnte) oder des *CLCNKA* (die diesen gemeinsam mit der Deletion von *CLCNKB* erklären würde) vermutet. Wegen der Blutsverwandtschaft der Eltern, der nachgewiesenen Heterozygotie für *BSND*, sowie der Homozygotie für *CLCNKA* / *CLCNKB* erschien *CLCNKA* als vielversprechenderer Kandidat für weitere Untersuchungen, da die homozygote Deletion von *CLCNKB* und gleichzeitige compound-heterozygote Mutation von *BSND* deutlich unwahrscheinlicher erschien.

Es wurde daher die Sequenzierung auf den Promotor von *CLCNKA* ausgeweitet. Der erfolgreich sequenzierte Abschnitt umfasst die ersten 119 Basen des ersten Exons von *CLCNKA*, sowie die davor liegenden 2.316 Basen. Die vollständige Sequenz ist im Folgenden wiedergegeben; die Nummerierung in der linken Spalte bezieht sich auf die erste Base der Zeile, die Zählung beginnt mit "1" bei der ersten Base von Exon 1 und "-1" bei der Base davor (eine Base "0" existiert somit nicht), die 19 bekannten SNPs sind einfach unterstrichen, wenn das häufigste bekannte Allel vorliegt, doppelt unterstrichen, wenn ein selteneres Allel vorliegt. In größerer Schrift hervorgehoben ist die Mutation G832A, die weiter unten ausführlicher beschrieben wird.

```
-2316 atgaataagg cagagacagg cccctgcttc caggccccacc tcatcataca
-2266 gaagaggaaa ctgaggctct agttgatgaa agagttaggg tcagcagagc
-2216 tgtgctggct tcaaaccggt catcctgctg agccaccctg gctgccctct
-2166 tctcagcctc ctggtgcaca cagggctggg gggtgagggt ggatgtggac
-2116 gtgcagtgct ggctgtggga cagtagccag cagctgcccc agaccagaca
-2066 ctggaaatcg ggatgttgac agggcagcca gttctgggtgc tgtgcagagt
-2016 caacaggctcg gggtggccaa ggtgaagggt ggctcgagtc catacagagc
```

-1966 ggcaactccc atccacctc ccacaacaca catctttgat tttgatttga
 -1916 cttgcctggc atctaggggc aaaggggtggc ccaggggtccc agattttaac
 -1866 aatcatccaa gggctatcat aagcttcaga ggggtggcttt gtctgggtgg
 -1816 gagtggaggc aattgtcccc aacctcttgc ccaaaagtgg catcagacac
 -1766 aactcttctg ttctgtgccc aaaccattgc cctggttcag cctcaggagc
 -1716 tggaggagct ttgggcaggg gaagagctgc acagtgtggg gctgggttca
 -1666 gcctctgctg tgtgaccttg gatgagtgc tcacctctct gaccatctac
 -1616 aaaatggcga ggctctcccc attcacaggg tgtggggagg aggacttgag
 -1566 ctgcagatgt gacgctcctg acacgtcgca ggcacacggc aggtgcttgt
 -1516 tcctcgccat gtcccctcac acctgtgctg ccacctctct ttgggggtgg
 -1466 acaaactctg tgggaattacc cagaagtccc caccagagcc gctggccctt
 -1416 ggacgtgtgc tttgagaagc atttcctgag cctggagggt ctggacacag
 -1366 gatcaagtcc gagttcctga cccaattca ctgccttgcc ccaggtgtcg
 -1316 gcctcctcgc cagccctggg caagatgggt catcaggatg ggaccgtgtg
 -1266 gcacagctg cgggcttttg agccaggcaa acctgggctg ggaatcctgg
 -1216 ctctgcctcg gcctccgtga tcttagacag gcagccccag ctccctgaga
 -1166 caccatttct ctacaacggg atcacgctgc ctgcctcgtg ggatttcctg
 -1116 gggcactcag ggtaattaat ctggggagaag gctgactctc tacctgacac
 -1066 acagggaggc tgtggtcatg ctggcccccac tcacctttgc ccgctgcct
 -1016 tctccttccc tcccagcct cctcccctct ccctctgtgc ttttcaaac
 -966 cttccatgtc cagctctgag acccctggac cctgagtctc agccttgga
 -916 gatgaccctt ctctgtcctg ctgtgtgcat gagctcccc ttcccagccc
 -866 tcgtccagca gcaccagga gcctgagtac agctAggcac caccctctgt
 -816 gcagctgtga tgggtgggga ggctcctgct ccccttctct cttggcagtt
 -766 ctgccctgca cagctctggc ctccacagtt ctggttggtt tgtcaaggac
 -716 gtttttaatc tccagggtaa accccggccg gcggggaagg ggggtggcag
 -666 ggagagagtg atgattggta gagcatatac ctgtccagggt gactggagc
 -616 tgggagcaaa ggaggctctg tgagaggagg gccagttcag ccgcagcagg
 -566 aggactgaca ggtgaggggt ctctgggcgt ggactggagt atgaacctgg
 -516 aagggccagg caggcagggc ataggggatg gtaggggcag tagccagcac
 -466 ctcaacttgg ctttgcagag gccttctggt cctgggggtt tcctgcctct
 -416 gtgacctgag ctgtcgggga gaaaggaggg tctccgaga ttggcaggga
 -366 gagtcggagc catccatggg actctgcagt gagagagtca cagccctggg
 -316 cagagactgc tcccagtagt ggaagcacca agcgaccag gaggggtggga
 -266 gcggtgtcca cagtctgctg ctggacacag ggggacacct aggaatccca
 -216 ccctcatccc aaaaaatgac acacacaggc acacaccctc agtgacggaa
 -166 cctcagggat gagggcacac acagacctag tgtgataaca cacacacaca
 -116 cgcacaatcc ttctcttca tttgggtggg gagagcactg gaagggccca
 -66 gaggcagcgc gaggacgtgc agcagctcac ccgggtcctt ccctccatct
 -16 gcttctccag gggcctgatg gaggagttgg tggggctgcg tgagggtctc
 +35 tcaggggacc ctgtgactct gcaggagctg tggggccctt gtccccacat
 +85 ccgccgagcc atccaagggt agagccaggt cctct

In den bekannten SNPs wies die Patientin keine Abweichung von den bekannten Allelen aus, allerdings fand sich 832 Basenpaare vor Exon 1 des *CLCNKA* eine Abweichung von der Wildtyp-Sequenz, die bisher nicht als SNP beschrieben wurde und bei der ein Guanin zu einem Adenin ausgetauscht ist (im Folgenden sei die Mutation G832A genannt).

Dieses Guanin ist das letzte Element einer E-Box, deren vollständige Sequenz CAGCTG lautet. Da dies die einzige Auffälligkeit in der Promotor-Sequenz war und zudem das Bindungsmotiv eines TFs von dieser Mutation betroffen war, wurde im Folgenden diese Mutation funktionell *in vitro* untersucht.

3.3. funktionelle Analyse der *CLCNKA*-Promotor-Mutation

3.3.1. Klonierung und Mutagenese

Um die funktionelle Bedeutung von G832A *in vitro* zu untersuchen wurde ein 2.000 Basen langes Fragment des *CLCNKA*-Promotors einer gesunden Vergleichsperson in einen Reportervektor kloniert. Dieses Promotorfragment stimmte bis auf einzelne SNPs und die Mutation G832A mit dem Promotor der Patientin überein.

Nach der Klonierung wurde die korrekte Orientierung innerhalb des Vektors, sowie die Unversehrtheit der Wildtypsequenz per Sequenzierung überprüft.

Per Mutagenese wurde dann die G832A-Mutation in den Vektor eingefügt und erneut per Sequenzierung bestätigt, dass zum einen die Mutation erfolgreich war und zum anderen die übrige Promotor-Sequenz intakt war.

3.3.2. funktionelle Messungen der Promotor-Aktivität

Nach Optimierung der Mengen der zu transfizierenden DNS (siehe auch 2.3.8./2.3.9.) wurde je Zelllinie in 21 Löchern einer 24-Loch-Zellkulturplatte mit einem den Wildtyp des *CLCNKA*-Promotors enthaltenden pGL3, sowie pRL-SV40 transfiziert. In 21 Löchern einer weiteren 24-Loch-Zellkulturplatte wurde mit einem die Mutation G832A des *CLCNKA*-Promotors enthaltenden pGL3, sowie pRL-SV40 transfiziert. Die verbleibenden je drei Löcher dienten als Leerwert-Kontrolle für die später verwendeten Substrate.

3.3.2.1. HEK

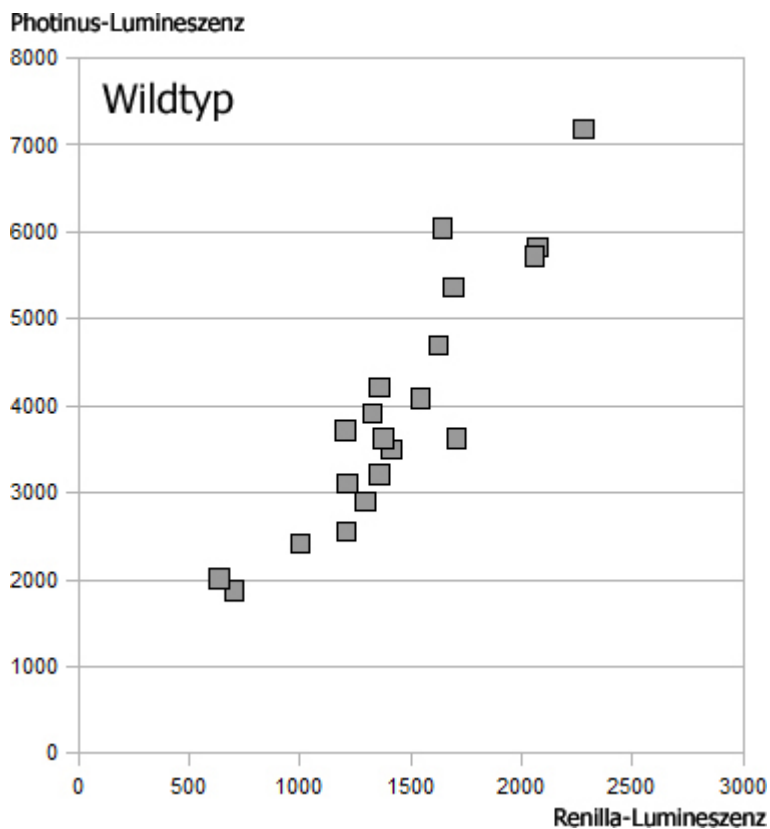


Abbildung 3.1.:
Graphische Darstellung
der Lumineszenz-Mess-
werte nach Expression
des Wildtyp-Promotors
in HEK-Zellen.

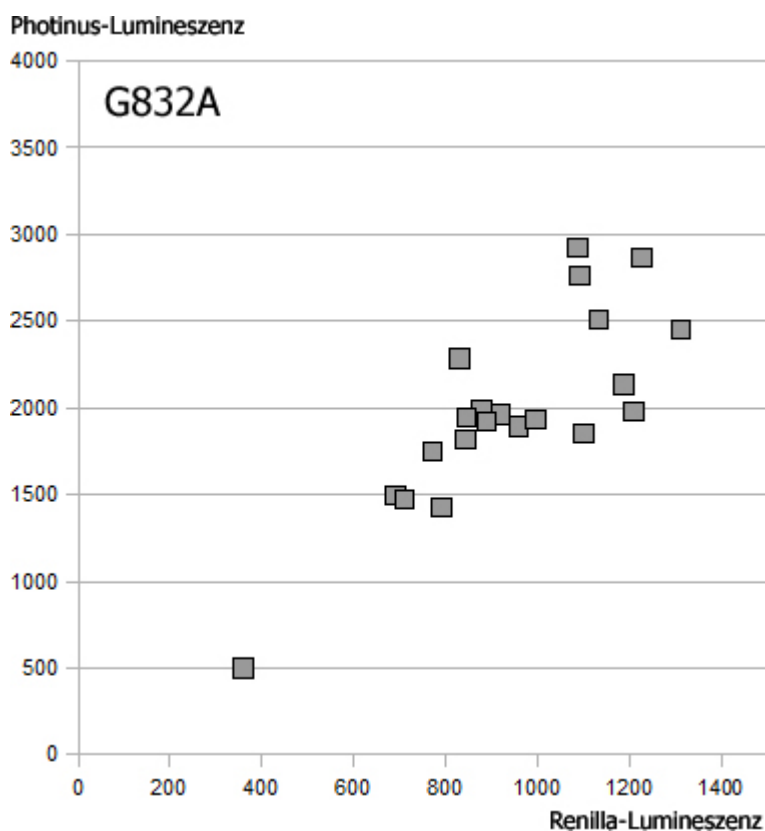


Abbildung 3.2.:
Graphische Darstellung
der Lumineszenz-Mess-
werte nach Expression
des G832A-Promotors
in HEK-Zellen. Man
beachte die zu
Abb. 3.1. verschiedene
Skalierung, die auf
unterschiedlichen
Transfektionseffizienzen
beruht.

3.3.2.2. MDCK

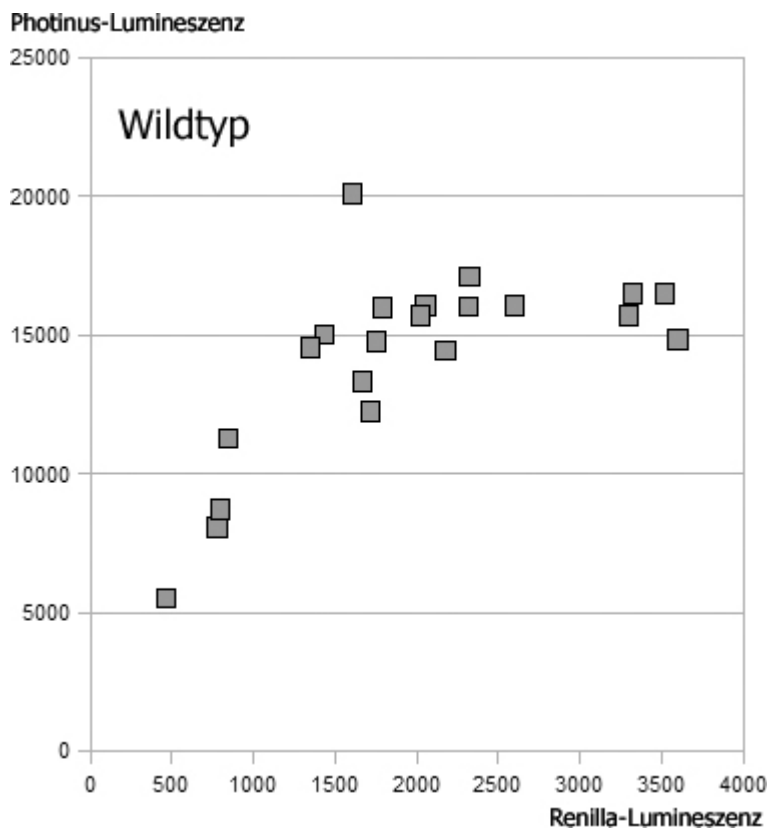


Abbildung 3.3.:
Graphische Darstellung
der Lumineszenz-Mess-
werte nach Expression
des Wildtyp-Promotors
in MDCK-Zellen.

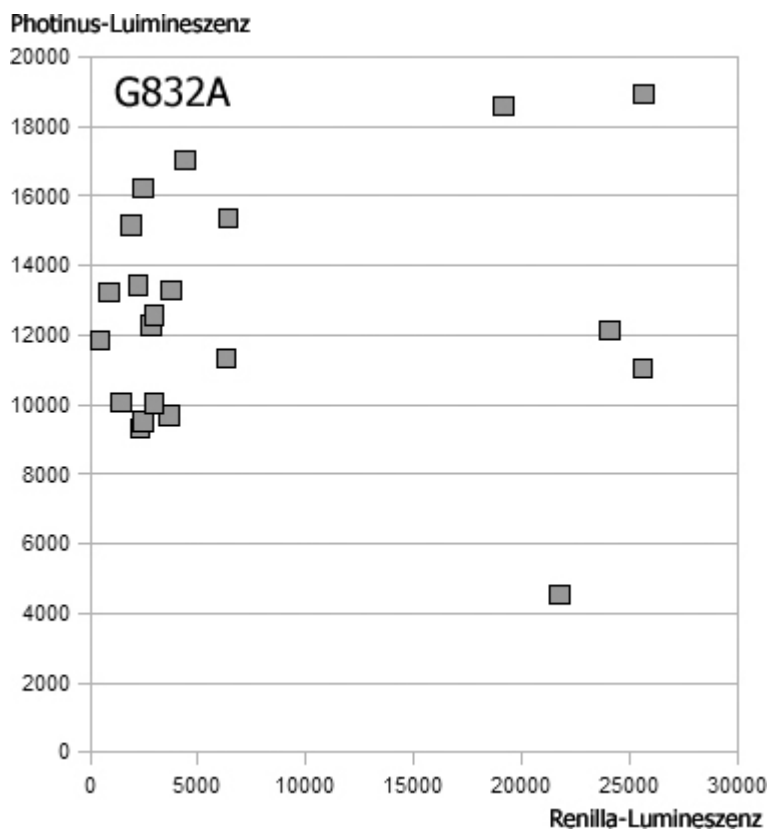


Abbildung 3.4.:
Graphische Darstellung
der Lumineszenz-Mess-
werte nach Expression
des G832A-Promotors in
MDCK-Zellen. Man
beachte die zu
Abb. 3.3. verschiedene
Skalierung, die auf
unterschiedlichen
Transformationseffizienz
beruht.
Siehe hierzu auch 4.2.3.

3.3.2.3. MDCT

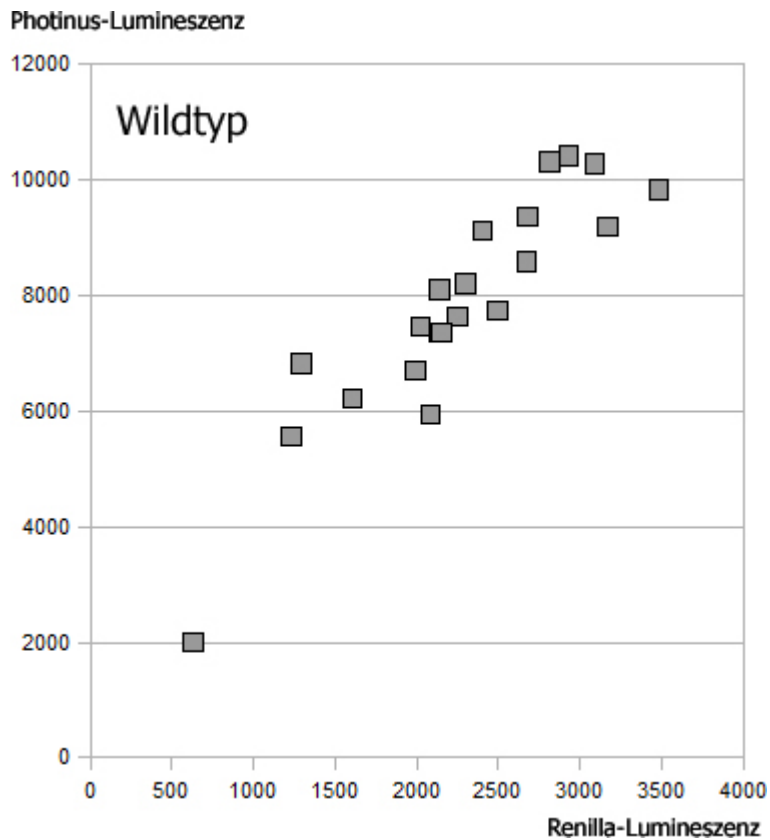


Abbildung 3.5.:
Graphische Darstellung
der Lumineszenz-Mess-
werte nach Expression
des Wildtyp-Promotors
in MDCT-Zellen.

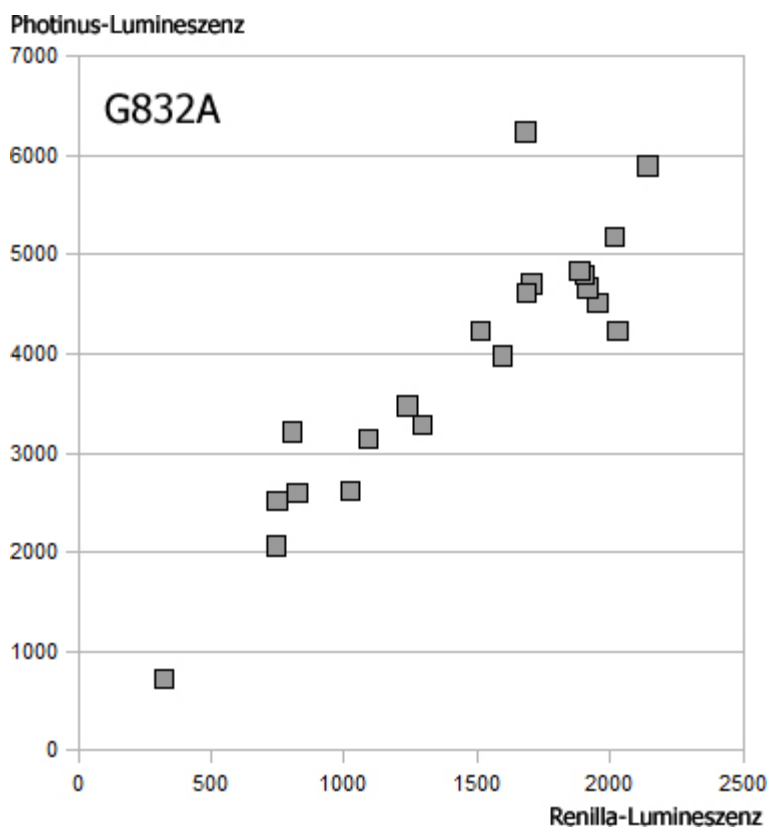


Abbildung 3.6.:
Graphische Darstellung
der Lumineszenz-Mess-
werte nach Expression
des G832A-Promotors in
MDCT-Zellen.
Man beachte die zu
Abb. 3.5. verschiedene
Skalierung, die auf
unterschiedlichen
Transfektionseffizienzen
beruht.

Tabelle 3.1: Gegenüberstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte in den untersuchten Zelllinien; der relativen Leuchtintensitäten, deren Standardabweichungen, sowie des Signifikanzniveaus der Differenzen zwischen Wildtyp-Promotor und dem G832A-Promotor.

Zelllinie	Mittelwert Photinus	Standardabw. Photinus	Mittelwert Renilla	Standardabw. Renilla	Quotient der Mittelwerte Phot. / Ren.	Standardabw. d. Quotienten Phot. / Ren.	Abnahme der Lumineszenz	Signifikanz
HEK (Wildtyp)	3884,3	1465,3	1397,5	442,1	2,78	1,37	-24,1%	< 0,05
HEK (G832A)	1993,1	548,5	944,1	224,0	2,11	0,767		
MDCK (Wildt.)	14234,5	3382,7	1973,0	913,3	7,22	3,75	-77,5%	< 0,005
MDCK (G832A)	12652,7	3437,7	7791,8	9058,6	1,62	1,94		
MDCT (Wildt.)	7817,0	1967,5	2265,0	687,4	3,45	1,36	-21,4%	< 0,05
MDCT (G832A)	3880,5	1329,3	1433,8	530,8	2,71	1,37		

Wie in Tabelle 3.1 ersichtlich, fand sich in allen drei untersuchten Zelllinien eine deutliche Reduktion der relativen Lumineszenzen (siehe auch Abbildung 3.10). Dabei zeigte sich in den HEK- und MDCT-Zellen jeweils eine Reduktion der relativen Lumineszenzen um über 20%, bei den MDCK-Zellen sogar um über 75%. Der t-Test für zwei unabhängige Stichproben ergab in allen drei Fällen Signifikanz ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,005$; siehe auch Abbildung 3.7).

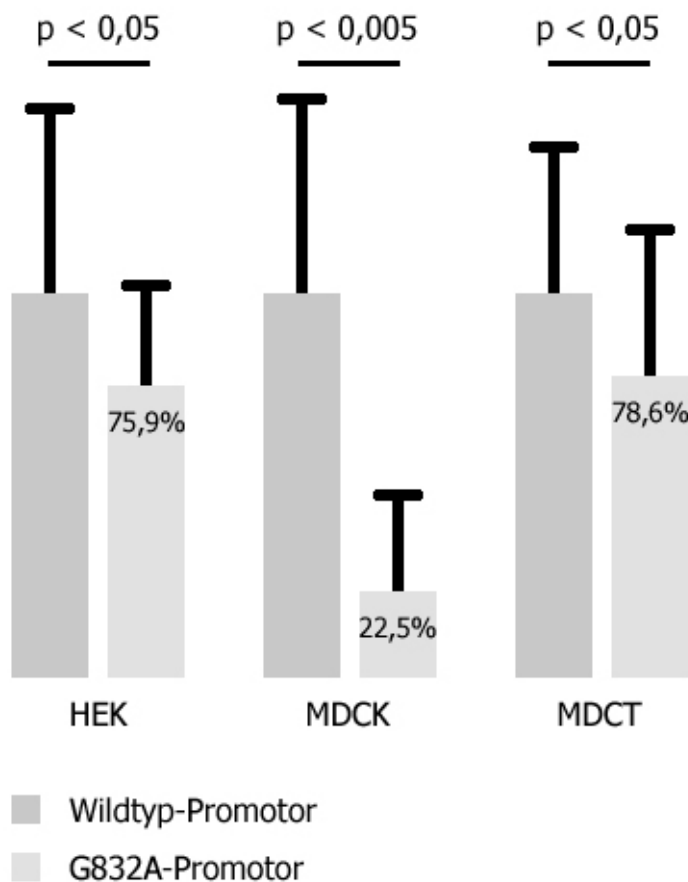


Abbildung 3.7: graphische Darstellung der Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen der Promotor-Mutation G832A. Dargestellt sind jeweils die relativen Lumineszenzen des Wildtyp- und des G832A-Promotors, sowie eine Standardabweichung.

4. Diskussion

Hereditäre Salzverlust-Tubulopathien sind eine Gruppe klinisch wie genetisch heterogener Erkrankungen, deren molekulare Ursache bei einer nicht geringen Anzahl von Patienten weiter ungeklärt bleibt. Seit der Erstbeschreibung des kBS [Bartter et al. 1962] und den ersten Arbeiten zu den Varianten des BS zu Grunde liegenden genetischen Ursachen [Simon et al. 1996 (1-3)] vergingen knapp 35 Jahre und auch in der jüngeren Vergangenheit werden weitere Subtypen klinisch charakterisiert und molekulargenetisch aufgeklärt [Bockenhauer et al. 2009, Scholl et al 2009].

Die Chloridkanäle ClC-Ka und ClC-Kb sind wesentlich an der Wasser- und Salz-Rückresorption in der Henle-Schleife und dem distalen Konvolut beteiligt. Mutationen oder funktionelle Verluste dieser Kanäle führen zu Salzverlust-Tubulopathien (wie im Falle des ClC-Kb als kBS und im Falle der Mutation von *BSND* durch Funktionsverlust von ClC-Ka und -Kb als aBS). Um ein besseres Verständnis dieser Erkrankungen zu erlangen und somit auch die Chancen einer, durch genetisches Screening ermöglichten, frühzeitigeren oder spezifischeren Therapie zu erhöhen, ist die genaue genetische Charakterisierung bisher ungeklärter Phänotypen von besonderem Interesse.

In vorausgegangenen Untersuchungen im Labor der Kinderklinik konnten mehrere solcher Patienten identifiziert werden und bei ihnen die bekannten genetischen Ursachen hereditärer Salzverlust-Tubulopathien ausgeschlossen werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bei einer dieser Patientinnen die genetische Grundlage ihres Phänotyps aufzuklären. Dabei konnte zum einen gezeigt werden, dass in den exonischen Anteilen der zum Phänotyp passenden Kandidatengene keine diesen Phänotyp ausreichend erklärenden Mutationen vorliegen (nämlich nur die Deletion von *CLCNKB* ohne funktionell bedeutsame Mutationen in den Exonen von *BSND* und *CLCNKA*); außerdem wurde Heterozygotie für die Gene *SLC12A1*, *KCNJ1* und *SLC12A3* nachgewiesen. Zum anderen wurde eine Mutation einer typischerweise von Transkriptionsfaktoren

erkannten Sequenz des Promotors von *CLCNKA* *nachgewiesen* und als funktionell bedeutsam charakterisiert.

4.1. Methodendiskussion

4.1.1. Phänotyp der Patientin und Planung der Experimente

Der Phänotyp der Patientin, die der Marburger Kinderklinik erst im Kleinkindalter zugewiesen wurde und deren prä- und postnatale Phase aus den an unserer Klinik vorliegenden Unterlagen nicht ganz vollständig zu rekonstruieren ist, erscheint nicht ganz typisch für einen der Subtypen des BS. Die Innenohr-Taubheit, die Hypokaliämie und der renale Salzverlust lassen am ehesten an ein BSND denken. Andererseits erscheint aber die fehlende Polyurie trotz offensichtlich ausreichender Flüssigkeits-Zufuhr und insbesondere das fehlende Polyhydramnion ungewöhnlich für dieses Krankheitsbild. Zum Letzteren ist zu sagen, dass sich in den vorliegenden Unterlagen keine Fruchtwassermenge dokumentiert ist und formal ein Polyhydramnion also nicht ausgeschlossen ist. Allerdings war die Schwangerschaft regelrecht gynäkologisch begleitet worden und bei keinem der pränatalen Ultraschalle, wie auch im Rahmen der Geburt, war eine ungewöhnliche Fruchtwassermenge dokumentiert, so dass am ehesten davon auszugehen ist, dass zumindest wohl kein für das aBS und BSND typisches Polyhydramnion vorgelegen haben dürfte.

4.1.2. Mikrosatelliten-Analyse

Aufgrund dieser Uneindeutigkeit erschien es sinnvoll, alle bekannten für Varianten des BS relevanten Gene auf Mutationen zu untersuchen. Um den methodischen Aufwand, der bei einer vollständigen Sequenzierung aller dieser Gene entsteht, zu reduzieren, wurde zuvor mittels Mikrosatelliten getestet, in welchem dieser Genloki die Patientin homozygot ist. Dieses Vorgehen erscheint

legitim, da bei allen betroffenen Genen eine funktionell bedeutsame Mutation beider Allele vorliegen muss, bevor es zu klinischen Symptomen kommt. Somit sind vier Konstellationen denkbar: erstens, die Patientin hat von beiden Eltern die gleiche Mutation geerbt; zweitens, die Patientin hat von jedem Elternteil eine andere Mutation geerbt; drittens, die Patientin hat von einem Elternteil ein mutiertes Allel geerbt, das beim anderen Elternteil mutierte Allel ist dann de novo funktionell bedeutsam mutiert; viertens in beiden bei den Eltern unmutiert vorliegenden Allelen ist eine de novo-Mutation aufgetreten.

Nur im ersten Fall liefert uns eine Mikrosatelliten-Analyse ein Ergebnis, mit dem der weitere Untersuchungsaufwand verringert werden kann. Andererseits aber ist dieser Fall bei blutsverwandten Eltern und in der Gesamtbevölkerung recht seltenen Mutationen der wahrscheinlichste, so dass die Suche nach einer homozygoten Mutation als Ursache der Erkrankung der Patientin gerechtfertigt erscheint.

Die Methodik der Mikrosatelliten-Analyse selbst zählt zu den Standardmethoden zum einen in der Diagnostik genetisch heterogener Erkrankungen, zum anderen bei der Suche nach Kandidatengenen ungeklärter Erkrankungen, insbesondere in blutsverwandten Familien. Dabei ist zu beachten, dass einerseits die Methodik nicht sensitiv genug ist, einzelne Gene zu identifizieren, sondern immer nur Gruppen von Genen bezüglich ihrer Zygotie erfasst werden können (was ja anhand der zugrundeliegenden biologischen Prozesse auch einleuchtend ist, da auch bei blutsverwandten Eltern nicht in schnellem Wechsel homo- und heterozygote Genabschnitte aufeinander folgen). Andererseits muss noch bedacht werden, dass natürlich der reine Nachweis von Hetero- oder Homozygotie in keinem Fall eine Kausalität nachweist oder ausschließt

4.1.3. Sequenzierungen / Fusionsfragment *CLCNKB*

Auch bei der direkten Sequenzierung handelt es sich um eine weit verbreitete Standardmethode. Dies gilt sowohl für die kommerzielle Sequenzierung, die im Rahmen dieser Arbeit insbesondere für lange Nukleotid-Sequenzen eingesetzt wurde, als auch für die Sequenzierung kürzerer Sequenzen im eigenen Labor. In der Regel lassen sich dabei sehr eindeutige Leseergebnisse im Inneren der untersuchten Sequenzen erreichen, wobei die randständigen zehn bis 20 Basen teilweise aus technischen Gründen schwieriger auszuwerten sind. Aus diesem Grund wurden bei Nukleotidsequenzen, die zur Sequenzierung in mehrere Abschnitte eingeteilt wurden (wie z.B. den Promotor von *CLCNKA*) die Primer so ausgewählt, dass ausreichend große Überlappungen zwischen den einzelnen Abschnitten auftraten, um auch hier die Sequenz sicher auslesen zu können. Bei Nukleotid-Sequenzen, die mit einer einzelnen Sequenzierung gelesen werden können (wie z.B. kurze Exone verschiedener Gene) wurden die Primer so gewählt, dass über 20 Basen Abstand zu den interessierenden Sequenzen bestand. Im Falle unerwarteter Ergebnisse (wie z.B. der Mutations-freien Sequenzierung von *CLCNKA* oder der Mutation G832A des *CLCNKA*-Promotors) wurden diese Ergebnisse kontrolliert, ggf. mit der komplementären (intern/extern) Untersuchungsmethodik.

Die Methodik, eine Deletion von *CLCNKB* mittels des Nachweises eines Fusionsfragmentes nachzuweisen, ist in der Diagnostik des aBS etabliert, da hier Deletionen des gesamten *CLCNKB*-Gens häufig Grundlage der Erkrankung sind [Simon et al. 1997, Konrad et al. 2000]. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer sind in der Routine-Diagnostik des aBS der hiesigen Kinderklinik etablierter Standard. Die Kürze des durch die Primer F1 und R nachgewiesenen Fusionsfragmentes zusammen mit der Positionierung dieser Primer relativ zu *CLCNKB* beweist hinreichend eine Deletion dieses Gens, bei der nicht von einem auch nur teilweise funktionellen Restprotein ausgegangen werden kann. Aus diesem Grund wurde auf eine Sequenzierung des Fusionsfragmentes verzichtet, durch das die exakten Deletions- und Fusionsstellen innerhalb des Genoms theoretisch nachweisbar, aber ohne

Bedeutung für eine genauere Erklärung des Phänotyps der beschriebenen Patientin wäre.

4.1.4. Zellkultur / funktionelle Untersuchungen

Die Auswahl der für die funktionellen Experimente kultivierten Zelllinien erfolgte aus dem begrenzten Pool der etablierten und kommerziell erhältlichen Linien. Der Grund für diese Entscheidung lag zum einen in der deutlichen Vereinfachung der Experimente durch die Wahl bereits seit langem, auch im hiesigen Labor, etablierter Zelllinien. Zum anderen besteht bei diesen Zellen der Vorteil, dass eine morphologische und funktionelle Charakterisierung dieser Zelllinien bereits in der Literatur vorliegt und damit die Einordnung der hier erarbeiteten Ergebnisse erleichtert. Optimal für die geplanten Experimente über die funktionelle Bedeutung einer *CLCNKA*-Promotor-Mutation wäre eine humane Zelllinie aus Zellen der Henle-Schleife und/oder des distalen Konvoluts erschienen. In dieser Form existiert eine solche Zelllinie aber nicht; als Kompromiss wurden verschiedene Zelllinien gewählt, die teils menschlichen und renalen Ursprungs, aber ansonsten undifferenzierten embryonalen Stammzellen (HEK) waren; teils waren diese tierischen Ursprungs, entstammten aber reiferen Tubulus- bzw. Sammelrohr-Zellen von Hund (MDCK) und Maus (MDCT). Bei diesen beiden Spezies besteht ja noch eine recht ausgeprägte Homologie zu den menschlichen Analoga Clc-Ka und -Kb (siehe 1.3.1. und 1.3.2.) Daher war davon auszugehen, dass für die Expression der vom *CLCNKA*-Promotor kontrollierten Luciferase in den funktionellen Experimenten innerhalb des Zellkultur-Modells möglichst optimale Bedingungen vorlagen.

Der wesentliche Nachteil der funktionellen Untersuchungen mittels zweier Luciferasen ist die große Entfernung dieses *in vitro*-Modells zur Situation *in vivo*. Die Steuerung der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren, insbesondere im Bereich des distalen Promotors, in dem die in dieser Arbeit neu beschriebene Mutation G832A liegt, ist *in vivo* von einer Vielzahl äußerer Einflussfaktoren

abhängig. Ob diese in einem Zellkulturmodell adäquat abgebildet werden, bleibt unabhängig von der Auswahl der Ursprungsspezies (MDCK und MDCT) oder der histologischen Nähe der Ursprungszellen zum klinisch interessanten Gewebe (HEK) immer fraglich. Ein Tiermodell, z.B. mit *knock in*-Mäusen, die eine äquivalente Promotor-Mutation tragen wäre grundsätzlich denkbar, aber technisch natürlich um mehrere Größenordnungen aufwändiger. So bleibt letztlich keine praktikable Alternative zu den hier durchgeführten Experimenten, um einen ersten Eindruck von der funktionellen Bedeutung der beschriebenen Promotor-Mutation zu gewinnen.

Die Zielgröße der funktionellen Experimente war der Quotient aus zwei unterschiedlichen Lumineszenzen, wobei die Schrittmacherenzyme der jeweiligen Leuchtreaktionen in verschiedenen Vektoren kodiert waren. Für eine möglichst wenig fehlerbehaftete Auswertung sollten hier zwei Voraussetzungen erfüllt sein. Zum einen sollten die Lumineszenzen der beiden Reaktionen im mittleren Messbereich des Luminometers liegen, um zwischen den Einzelmessungen möglichst keine Messungenauigkeiten durch Erreichen der Randbereiche zu haben; außerdem sollten die Lumineszenzen der von den beiden Luciferasen katalysierten Reaktionen nicht zu unterschiedlich sein. Um beide Ziele zu erreichen, wurden in Vorexperimenten die für die Transfektion jeweils notwendigen DNS-Mengen für die drei Zelllinien bestimmt. Zum anderen muss darauf geachtet werden, dass bei allen Transfektionen ein identisches Verhältnis von pGL3- zu pRL-SV40-DNS sowohl bei den Wildtyp-, als auch bei den G832A-Mutations-Experimenten eingehalten wird, um eine Vergleichbarkeit der durch Renilla-Luciferase normierten Expressionen der Photinus-Luciferase zu gewährleisten. Dafür wurde die DNS-Konzentration der Wildtyp- und G832-pGL3-DNS direkt vor den Experimenten photometrisch bestimmt und zudem für zu vergleichende Experimente dieselbe pRL-SV40-Lösung verwendet. Ebenso wurde für zu vergleichende Wildtyp- und Mutations-Experimente dieselbe Zellkultur-Passage auf 24-Loch-Platten verteilt, um Unterschiede in der Qualität der transfizierten Zellen zu minimieren.

4.1.5. Statistik

Für den zur Prüfung der statistischen Signifikanz herangezogenen t-Test für zwei unabhängige Stichproben (in diesem Fall die Quotienten aus der Lumineszenz von Photinus und Renilla) müssen drei Anforderungen von diesen erfüllt werden. Zum ersten ist dies natürlich die Unabhängigkeit der Stichproben, die in den vorliegenden Experimenten natürlich gegeben war, da die Durchführung der Experimente mit Wildtyp- und Mutations-DNS parallel aber vollständig voneinander getrennt durchgeführt wurden.

Die zweite Voraussetzung ist, dass die Grundgesamtheit, auf der die Stichproben beruhen, normalverteilt ist. Dies ist einerseits grundsätzlich aus dem experimentellen Aufbau ersichtlich und wurde zusätzlich dadurch sichergestellt, dass die Lumineszenzen nicht in den Rändern des Messbereichs des Luminometers lagen. Auf einen Test auf Normalverteilung der Grundgesamtheit wurde daher verzichtet.

Die dritte Voraussetzung ist, dass die Standardabweichung in beiden Stichproben gleich ist. Dies ergibt sich in den vorliegenden Experimenten aus dem identischen Aufbau. Der zu untersuchende Unterschied im Mittelwert bei Wildtyp- und G832-Promotor wäre bei den zu untersuchenden Stichproben auf die Mutation zurückzuführen; bei ansonsten identischem Versuchsaufbau ist aber von keinem Unterschied in der Standardabweichung, die ja Methoden- oder Messgerät-bedingt wäre, auszugehen. Daher bestanden also keine Bedenken gegen die Testung der Signifikanz der Messergebnisse durch den t-Test für zwei unabhängige Stichproben.

4.2. Ergebnisdiskussion

4.2.1. *SLC12A1*, *KCNJ1* und *BSND*

Einerseits der Nachweis, dass die Gene *SLC12A1*, *KCNJ1* und *BSND* bei der Patientin heterozygot vorliegen, andererseits die Tatsache, dass mit den unter 3.2. und 3.3. vorgetragenen Ergebnissen eine Erklärung des eher untypischen Phänotyps möglich ist (siehe unten), lassen eine weitere Untersuchung dieser Gene und ggf. z.B. auch ihrer Promotoren für nicht notwendig erscheinen. Wie schon an anderer Stelle diskutiert, spricht die hier vorliegenden Familienkonstellation ja ohnehin mehr für eine homozygote Mutation (bzw. Mutationen) als für eine (jetzt noch zusätzliche!) compound-heterozygote Mutation. Dass eine solche neben der gemeinsamen Mutation / Deletion von *CLCNKA*-Promotor und *CLCNKB* bei blutsverwandten Eltern vorliegen und für den Phänotyp notwendig sein soll, wirkt sehr unwahrscheinlich.

4.2.2. Deletion von *CLCNKB* / Mutation des *CLCNKA*-Promotors

Auf den ersten Blick mag die hier beschriebene Konstellation, wenn auch wahrscheinlicher als eine weitere compound-heterozygote Mutation, so doch ungewöhnlich erscheinen. Allerdings besteht eine enge räumliche Beziehung zwischen *CLCNKA* und *CLCNKB*, die in unmittelbarer Nachbarschaft auf Chromosom 1p36 liegen und somit naturgemäß seltener von Rearrangements betroffen sind, als weiter auseinander liegende Gene. Eine ähnliche Konstellation (hier in einer nicht konsanguinen Familie), bei der zwei exonische Mutationen in *CLCNKA* und *CLCNKB* zusammentreffen und zu einem *BSND*-Phänotyp führen, ist ja bereits in der Literatur beschrieben [Nozu et al. 2008].

4.2.3. funktionelle Untersuchungen der G832A-Mutation

Die Schwierigkeit der grundsätzlichen Bewertung der klinischen Relevanz der gefundenen Mutation wurde ja bereits in 4.1.4. besprochen. Ebenso muss die Bedeutung der nicht-vollständigen Suppression der Photinus-Luciferase in den vorliegenden Experimenten besprochen werden, was unter 4.3. gesehen wird.

An dieser Stelle soll auf die Unterschiede der Ergebnisse in den Zelllinien HEK und MDCT auf der einen (3.3.2.1. und 3.3.2.3.) und MDCK auf der anderen Seite (3.3.2.2.) eingegangen werden. Allein ein Blick auf die Punktwolken, in denen die Rohdaten dargestellt sind (Abb. 3.3. und 3.4.), zeigt, dass die Daten gerade nach Expression des G832-Mutation nicht die erwartete lineare Beziehung zwischen Renilla- und Photinus-Lumineszenz zeigen. In den übrigen Abbildungen (3.1. bis 3.3., 3.5. und 3.6.) findet man Messpunkte, die entweder einer gleichzeitig niedrigen Renilla- und niedrigen Photinus-Lumineszenz oder einer parallel hohen Lumineszenz beider Leuchtreaktionen entspricht. Diese gleichförmigen Unterschiede entsprechen unterschiedlichen Effizienzen in den vorangegangenen Transfektionen. Eine ähnliche Beziehung erkennt man (zumindest bei Renilla-Lumineszenzen unterhalb von 3.000) auch in Abbildung 3.3., die den Wildtyp-Promotor repräsentiert, nicht aber in Abbildung 3.4. für den G832A-Promotor.

Die Ursache für diese Ergebnisse ist sicherlich durch mindestens zwei Faktoren mit bedingt. Zum einen scheint MDCK für den gewählten experimentellen Ansatz weniger gut geeignet zu sein, als HEK und MDCT. Die Zweitgenannten zeigen ein deutlich schnelleres Wachstum, was sich in den kürzeren Passagierungs-Intervallen äußert. Bei allen Zelllinien mussten nach Transfektion nach 48 Stunden die funktionellen Messungen erfolgen, da laut Hersteller ansonsten Verfälschungen der Messergebnisse nicht ausgeschlossen sind. Möglicherweise wäre aber ein längerer Zeitraum für eine optimale Expression der transfizierten Gene in der Zelllinie MDCK günstiger. Leider boten tatsächlich Experimente mit um sechs bis 24 Stunden verlängerten Inkubationen keine besseren Ergebnisse.

Eine andere Möglichkeit, durch die auch die in den Wildtyp-Experimenten noch erhaltene lineare Beziehung zwischen Photinus- und Renilla-Lumineszenz erklärt, wäre, dass unter den *in vitro*-Bedingungen in den MDCK-Zellen die Expression des vom *CLCNKA*-Promotor kontrollierten Luciferase-Gens deutlich stärker von der Funktionsfähigkeit der mutierten E-box abhängig ist. Dies könnte mit dem in den MDCK-Zellen vornehmlich exprimierten Transkriptionsfaktoren zusammenhängen. Wie es zu den Messpunkten mit Renilla-Lumineszenzen jenseits von 19.000 kommt, wird durch diese Vorstellung nicht erklärt, allerdings konnten ähnliche Messpunkte in allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit MDCK beobachtet werden. Betrachtet man ausschließlich die Messpunkte mit einer Renilla-Lumineszenz unterhalb von 9.000 (siehe Abb. 4.1.) gewinnt man den Eindruck, dass (entsprechend einer unterschiedlichen Transfektionseffizienz) verschiedene Renilla-Lumineszenzen beobachtet werden, nicht jedoch eine dazu lineare Beziehung der Photinus-Lumineszenzen. Dies ließe sich mit einer unter den in MDCK herrschenden höchst ausgeprägten Verminderung der Expression der vom mutierten *CLCNKA*-Promotor Photinus-Luciferase sehr gut erklären.

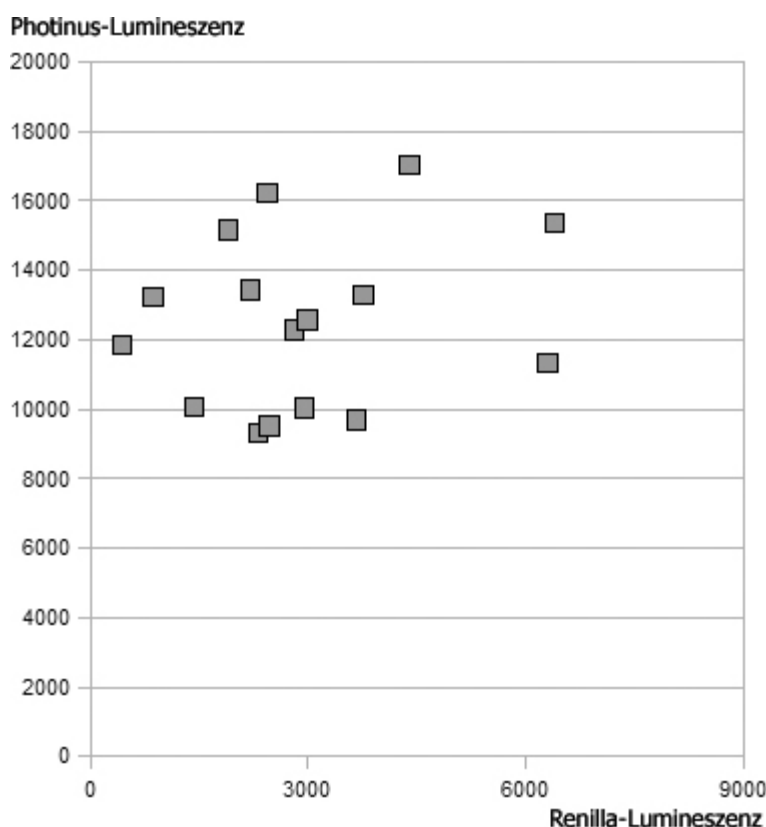


Abbildung 4.1.:
Graphische Darstellung der Lumineszenz-Messwerte nach Expression des G832A-Promotors in MDCK-Zellen für Renilla-Lumineszenzen unter 9.000. Vergleiche dazu auch Abb. 3.4.

Diese Interpretation wird auch von der in Abb. 4.2. gezeigten Darstellung der linearen Regressionskurven (für den Wildtyp-Promotor in 4.2.a, für den G832A-Promotor in 4.2.b) gestützt. Hier ist die in 4.2.b nahezu parallel zur X-Achse verlaufende Regressionskurve ein Hinweis auf die Unabhängigkeit der Transfektionseffizienz (dargestellt als Renilla-Lumineszenz) für die Expression der Photinus-Luciferase.

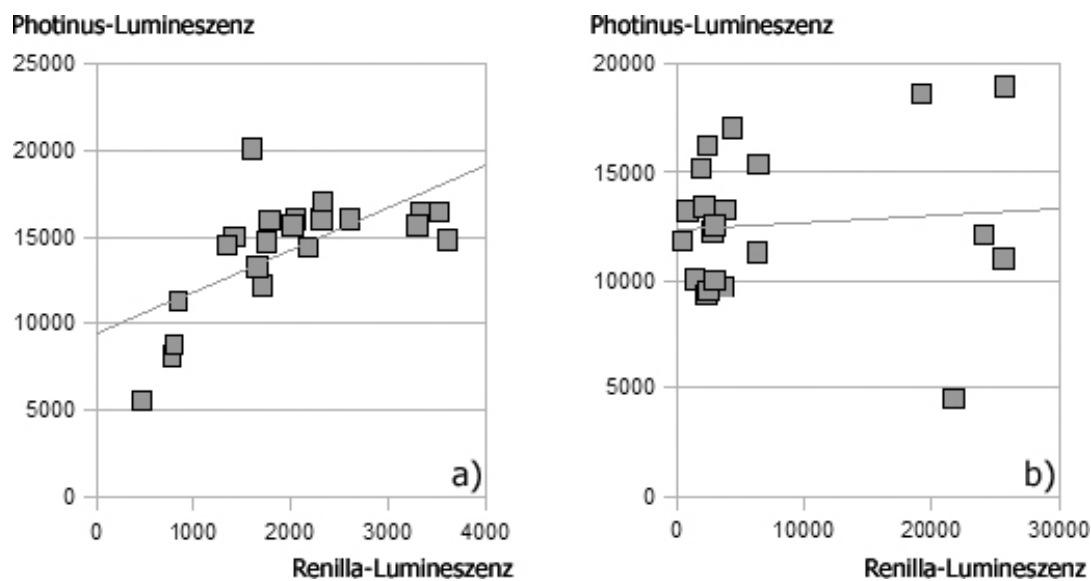


Abbildung 4.2.:

Darstellung der linearen Regressionskurven für den Wildtyp- (a) und den G832A-Promotor (b) nach Expression in MDCK-Zellen. Vergleiche hierzu auch die Abbildungen 3.3. und 3.4.

Ob das Ergebnis in den MDCK-Zellen nun in größeren Maße den den physiologischen Realitäten *in vivo* noch entspricht, als die Ergebnisse aus den HEK- und MDCT-Zellen, lässt sich natürlich aus den vorliegenden Daten nicht ablesen.

4.3. Schlussfolgerungen

Die vorliegenden Ergebnisse deuten drauf hin, dass der von der Patientin gezeigte Phänotyp, der dem eines BSND ähnlich ist, aber nicht in allen Details mit ihm übereinstimmt, durch die homozygote Deletion des *CLCNKB* und den ebenfalls homozygoten Austausch eines Guanins zu einem Adenin im Promotor 832 Basen vor Exon 1 des *CLCNKA* bedingt ist.

Dies ist die erste Beschreibung einer Erkrankung aus dem Bereich der Salzverlust-Tubulopathien, bei der die Mutation eines Promotors von entscheidender klinischer Bedeutung ist. Wäre nämlich lediglich allein die Deletion von *CLCNKB* für den Phänotyp verantwortlich, so wäre der Phänotyp eines kBS, insbesondere ohne Taubheit, zu erwarten gewesen.

Die wesentliche Frage an dieser Stelle bleibt, ob die beobachtete Reduktion des vom mutierten Promotor kontrollierten Reportergens auf gut 22% in MDCK, bzw. um 75-80% in HEK und MDCT ausreicht, den deutlich schwereren Phänotyp bei der Patientin zu erklären. Hierzu muss zum einen bemerkt werden, dass natürlich die *in vitro*-Ergebnisse nicht eins-zu-eins auf die Situation *in vivo* übertragen werden können und die funktionelle Bedeutung einer solchen Reduktion bei gleichzeitiger Deletion von *CLCNKB* erst recht unklar ist. Letztlich ist derzeit noch zu wenig bekannt über die Koexpression von CIC-Ka und -Kb, bzw. die Situation nach Deletion von *CLCNKB*. So bleiben vorerst alle Betrachtungen an dieser Stelle noch spekulativ, aber es ist beispielsweise vorstellbar, dass die Deletion von *CLCNKB* eine kompensatorische Überexpression von CIC-Ka im Vergleich zu gesunden Personen nach sich zieht, die im Falle der hier beschriebenen Patientin wiederum durch die Mutation des *CLCNKA*-Promotors gestört ist. Somit wäre dann nicht nur eine Unterexpression des CIC-Ka, sondern die noch größere Differenz zur eigentlich gewünschten Überexpression entscheidend für den klinischen Phänotyp.

4.4. Ausblick

Wie schon unter 4.3. angesprochen, bleiben natürlich auch nach Aufklärung der genetischen Ursache der Erkrankung der unter 1.5.1. beschriebenen Patientin grundlegende Fragen zum Verständnis der Physiologie der renalen Salz-Reabsorption im Allgemeinen und der Salzverlust-Tubulopathien im Speziellen unbeantwortet. Diese in nachfolgenden Experimenten zu beantworten wäre sicherlich ein lohnendes Unterfangen.

Den Einfluss der An- oder Abwesenheit bestimmter Transkriptionsfaktoren auf die Expression der vom *CLCNKA*-Promotor kontrollierten Luciferase zu untersuchen, könnte auf verschiedene Art und Weise neue Erkenntnisse bringen. Zum einen könnte versucht werden durch entsprechend konstruierte si-RNS die Bindung von Transkriptionsfaktoren auch an den Wildtyp-Promotor zu stören. Eine unter diesen Umständen signifikante Reduktion im Vergleich zur Koexpression des Wildtyp-Promotors mit unspezifischer si-RNS würde die funktionelle Bedeutung der beschriebenen Mutation weiter unterstreichen. Zudem könnten über entsprechende Datenbanken, in denen die von Transkriptionsfaktoren erkannten DNS-Sequenzen hinterlegt sind, TF-Kandidaten identifiziert werden, deren Interaktion mit der von der Mutation betroffenen *CLCNKA*-E-box an der Regulation der Expression von ClC-Ka beteiligt sind. Wenn bei Interferenz mit deren Translation, ebenfalls über si-RNS, kein signifikanter Unterschied zwischen der Photinus-Luciferase-Expression beim Wildtyp-Promotor plus spezifischer si-RNS und dem mutierten Promotor plus unspezifischer si-RNS nachweisbar wäre, könnte dadurch die spezifische Regulation der Expression von *CLCNKA* besser verstanden werden.

Um die Hypothese einer gestörten Hochregulation der ClC-Ka-Expression in der hier beschriebenen Patientin zu untermauern, wäre es von großem Interesse, mehr über die physiologischen Expressionsmuster von ClC-Ka bei Patienten mit kBS zu erfahren. Dies wäre beispielsweise im Tiermodell bei *Clcnkb-knockout*-Mäusen auf RNS-, Protein- und histologischer Ebene möglich. Untersuchungen beim Menschen wären zumindest auf immunhistochemischer Ebene bei aus

anderen Gründen notwendigen Nierenbiopsien ggf. möglich. Hierzu müssten dann Histologien von Patienten mit kBS mit denen von Patienten, die aus gleichen Gründen nierenbiopsiert wurden, verglichen werden.

Ein weiterer tierexperimenteller Ansatz wäre der Versuch, entweder bei gesunden Mäusen, oder bei den oben beschriebenen knockout-Tieren, einen *knock in* mit einer Promotor-Mutation des *Clcnka*, dem Maus-Homolog zu *CLCNKA*, zu generieren. Diese Tiere würden eine Vielzahl von Experimenten von der DNS- bis zur histologischen Ebene, sowie funktionelle Untersuchungen ermöglichen. Hier läge die Schwierigkeit sicher insbesondere in der korrekten Identifizierung einer homologen Promotor-Mutation des *Clcnka*.

Ob die Erkenntnisse aus dieser Arbeit oder darauf aufbauende Ergebnisse in absehbarer Zukunft zu einem neuen therapeutischen Ansatz für die betroffene Patientin, oder gar andere Patienten, führen, erscheint momentan eher unwahrscheinlich. Bevor nicht gentherapeutische Ansätze erfolgreicher eingesetzt werden können, wird wohl ein entsprechender klinischer Benefit für diese Patientin ausbleiben. Wenn dieses Ziel jedoch einmal erreicht ist, kann natürlich jeder Patient dessen genetischer Defekt aufgeklärt ist, auf eine deutliche Linderung seiner Beschwerden hoffen.

5. Zusammenfassung

Für die enormen Transportleistungen der Niere bei der Reabsorption von Salz und Wasser, sowie auch für die Ausbildung der für die Schallempfindung im Innenohr wesentlichen elektrochemischen Gradienten spielen unter anderem die ClC-K-Chloridkanäle eine bedeutende Rolle. Dies wird unter anderem bei bestimmten Subtypen der Salzverlust-Tubulopathien deutlich. Trotz großer Fortschritte, die seit Ende der 1990er Jahre bei der Aufdeckung der molekulargenetischen Grundlagen dieser Erkrankungen gemacht wurden, bleibt auch heute noch bei einem nicht unbeträchtlichen Teil der klinisch betroffenen Patienten die genetische Grundlage ihrer Erkrankung ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde für eine dieser Patientinnen eine Kombination aus der Deletion des für ClC-Kb kodierenden Gens *CLCNKB* und der Mutation des Promotors des für ClC-Ka kodierenden Gens *CLCNKA* als genetische Grundlage ihres klinischen Phänotyps aufgeklärt.

Hierzu wurde zunächst eine homozygote Mutation eines Teils der bekannten zu Salzverlust-Tubulopathien führenden Gene ausgeschlossen. Die verbleibenden bekannten Gene *CLCNKA* und *CLCNKB* sollten in einem zweiten Schritt sequenziert werden. Dies gelang bei *CLCNKB* nicht, da hier eine homozygote Mutation vorlag, was durch den Nachweis eines Fusionsfragmentes bewiesen werden konnte. Die exonischen Anteile von *CLCNKA* zeigten zwar keine die Aminosäure-Sequenz von ClC-Ka verändernden Mutation, wohl aber eine Mutation des Promotors von *CLCNKA* 832 Basen *upstream* seines ersten Exons.

Die funktionelle Bedeutung dieser Promotor-Mutation wurde mittels eines Versuches nachgewiesen, bei dem ein Biolumineszenz katalysierendes Enzym als Markerprotein genutzt wurde, um den Expressionslevel eines vom Wildtyp-*CLCNKA*-Promotors im Vergleich zu seiner mutierten Variante kontrollierten Gens darzustellen. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die bei der Patientin nachgewiesene Promotor-Mutation zu einer bis zu 77,5%-igen Reduktion der Expression des von diesem Promotor kontrollierten Gens führt.

Dass der gleichzeitige Funktionsverlust von ClC-Ka und ClC-Kb zu einem deutlich schwereren Phänotyp führt, als der isolierte Verlust eines dieser beiden Proteine, wurde in der Vergangenheit mehrfach gezeigt. Die vorliegende Arbeit liefert einen Hinweis darauf, dass der deutlich mildere Phänotyp bei isoliertem Funktionsverlust von ClC-Kb (im Vergleich zum funktionellen Verlust beider ClC-K-Kanäle) möglicherweise durch eine Hochregulation der Expression von ClC-Ka bedingt ist, da nicht der vollständige funktionelle Verlust des Zweiteren, sondern bereits die bloße Störung der Kontrolle seines Expressionslevels, zu einem schweren klinischen Phänotyp führt.

6. Literaturverzeichnis

Arant BS, Bracket NC., Young RB, Stil, WJS (1970) Case studies of siblings with juxtaglomerular hyperplasia and secondary aldosteronism associated with severe azotemia and renal rickets - Bartter's syndrome or disease? *Pediatrics* 46: 344-361.

Ashcroft FM (2000) *Ion channels and disease*. Academic Press

Baehler RW, Work J, Kotchen TA, McMorrow G, Guthrie G (1980) Studies on the pathogenesis of Bartter's syndrome. *Am J Med* 69: 933-938

Bartter FC, Pronove P, Gill, JR, MacCardle RC (1962) Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis: a new syndrome. *Am J Med* 33: 811-828

Benizri E, Ginouvès A, Berra E (2008) The magic of the hypoxia-signaling cascade. *Cell Mol Life Sci* 65: 1133–1149

Birkenhager R, Otto E, Schurmann MJ, Vollmer M, Ruf E-M, Maier-Lutz I, Beekmann F, Fekete A, Omran H, Feldmann D, Milford DV, Jeck N, Konrad M, Landa, D, Knoers NVAM, Antignac C, Sudbrak R, Kispert A, Hildebrandt F (2001) Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nature Genet* 29: 310-314

Bockenhauer D, Feather S, Stanescu HC, Bandulik S, Zdebik AA, Reichold M, Tobin J, Lieberer E, Sterner C, Landouze G, Arora R, Sirimanna T, Thompson D, Cross JH, van't Hoff W, Al Masri O, Tullus K, Yeung S, Anikster Y, Klootwijk E, Hubank M, Dillon MJ, Heitzmann D, Arcos-Burgos M, Knepper MA, Dobbie A, Gahl WA, Warth R, Sheridan E, Kleta R. Epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations (2009) *N Engl J Med* 360: 1960-1970.

- Burchard EG, Silverman EK, Rosenwasser LJ, Borish L, Yandava C, Pillari A, Weiss ST, Hasday J, Lilly CM, Ford JG, Drazen JM (1999) Association between a sequence variant in the IL-4 gene promoter and FEV1 in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 919-922
- Chalepakis G, Fritsch R, Fickenscher H, Deutsch U, Goulding M, Gruss P (1991) The molecular basis of the undulated / Pax-1 mutation. *Cell* 66: 873-884
- Corey DP (2006) What is the hair cell transduction channel? *J Physiol* 576: 23-28.
- deJong PE, Donker AJM, van der Wall E, Erkelens DW, van der Hem GK, Doorenbos H (1980) Effect of indomethacin in two siblings with a renin-dependent hypertension, hyperaldosteronism, and hypokalemia. *Nephron* 25: 47-52
- de Vries E, van Driel W, van den Heuvel SJL, van der Vliet PC (1987) Contactpoint analysis of the HeLa nuclear factor I recognition site reveals symmetrical binding at one side of the DNA helix. *EMBO J* 6: 161-168
- Dillon MJ, Shah V, Mitchell MD. Bartter's syndrome: 10 cases in childhood: results of long-term indomethacin therapy (1979) *Quart J Med* 48: 429-446
- Evan G, Harrington E, Fanidi A, Land H, Amati B, Bennett M (1994) Integrated control of cell proliferation and cell death by the c-myc oncogene. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 345: 269-275
- Fava C, Montagnana M, Rosberg L, Burri P, Almgren P, Jonsson A, Wanby P, Lippi G, Minuz P, Hulthen LU, Aurell M, Melander O (2008) Subjects heterozygous for genetic loss of function of the thiazide-sensitive cotransporter have reduced blood pressure. *Hum Molec Genet* 17: 413-418

- Finer G, Shalev H, Birk OS, Galron D, Jeck N, Sinai-Treiman L, Landau D (2003) Transient neonatal hyperkalemia in the antenatal (ROMK defective) Bartter syndrome. *J Pediatr* 142: 318-323
- Fisher SE, Black GC, Lloyd SE, Hatchwell E, Wrong O, Thakker RV, Craig IW (1994) Isolation and partial characterization of a chloride channel gene which is expressed in kidney and is a candidate for Dent's disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis). *Hum Mol Genet* 3: 2053-2059
- Gardner J, Lapey A, Simopoulos AP, Bravo E (1970) Evidence for a primary disturbance of membrane transport in Bartter's syndrome and Liddle's syndrome. *J Clin Invest* 49: 32A
- Gausch CR, Hard WL, Smith TF (1966) Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc Soc Exp Biol Med* 122: 931-935
- Gill G (2001) Regulation of the initiation of eukaryotic transcription. *Essays Biochem* 37: 33-43
- Gitelman HJ, Graham JB, Welt LG (1966) A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Trans Assoc Am Phys* 79: 221-235
- Guyton AC, Hall JE (2005) Textbook of medical physiology, 11th edition. W.B. Saunders
- Haug K, Warnstedt M, Alekov AK, Sander T, Ramirez A, Poser B, Maljevic S, Hebeisen S, Kubisch C, Rebstock J, Horvath S, Hallmann K, Dullinger JS, Rau B, Haverkamp F, Beyenburg S, Schulz H, Janz D, Giese B, Müller-Newen G, Propping P, Elger CE, Fahlke C, Lerche H, Heils A (2003) Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. *Nat Genet* 33: 527-532
- Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M (2004) AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 117: 5965-5973

- International Collaborative Study Group for Bartter-like Syndromes (1997) Mutations in the gene encoding the inwardly-rectifying renal potassium channel, ROMK, cause the antenatal variant of Bartter syndrome: evidence for genetic heterogeneity. *Hum Molec Genet.* 6: 17-26
- Jeck N, Konrad M, Peters M, Weber S, Bonzel KE, Seyberth HW (2000) Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, leading to a mixed Bartter-Gitelman phenotype. *Pediatr Res* 48: 754-758
- Jeck N, Reinalter SC, Henne T, Marg W, Mallmann R, Pasel K, Vollmer M, Klaus G, Leonhardt A, Seyberth HW, Konrad M (2001) Hypokalemic salt-losing tubulopathy with chronic renal failure and sensorineural deafness. *Pediatrics* 108: e5
- Kleta R, Basoglu C, Kuwertz-Broking E (2000) New treatment options for Bartter's syndrome. *New Eng J Med* 343: 661-662
- Kleta R, Bockenhauer D (2006) Bartter Syndromes and Other Salt-Losing Tubulopathies. *Nephron Physiol* 104: 73-80
- Knoers N und Levtschenko EN. Gitelman syndrome (2008) *Orphanet J Rare Dis* 3: 22
- Koch MC, Steinmeyer K, Lorenz C, Ricker K, Wolf F, Otto M, Zoll B, Lehmann-Horn F, Grzeschik KH, Jentsch TJ (1992) The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* 257: 797-800
- Konrad M, Leonhardt A, Hensen P, Seyberth HW, Kockerling A (1999) Prenatal and postnatal management of hyperprostaglandin E syndrome after genetic diagnosis from amniocytes. *Pediatrics* 103: 678-683

- Konrad M, Vollmer M, Lemmink HH, van den Heuvel LP, Jeck N, Vargas-Poussou R, Lakings A, Ruf R, Deschenes G, Anitgnac C, Guay-Woodford L, Knoers NV, Seyberth HW, Feldmann D, Hildebrandt F (2000) Mutations in the chloride channel gene CLCNKB as a cause of classic Bartter syndrome. *J Am Soc Nephrol* 11: 1449-1459
- Korver W, Roose J, Clevers H (1997) The winged-helix transcription factor Trident is expressed in cycling cells. *Nucl Acids Res* 25: 1715-1719
- Kulozik AE, Bellan-Koch A, Bali S, Kohne E, Kleihauer E (1991) Thalassemia intermedia: moderate reduction of beta globin gene transcriptional activity by novel mutation of the proximal CACCC promoter element. *Blood* 77: 2054-2058
- Landau D, Shalev H, Ohaly M, Carmi R (1995) Infantile variant of Bartter syndrome and sensorineural deafness: a new autosomal recessive disorder. *Am J Med Genet* 59: 454-459
- Lang F, Vallon V, Knipper M, Wangemann P (2007) Functional significance of channels and transporters expressed in the inner ear and kidney. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C1187-C1208
- Latchman DS (1997) Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1305-1312
- Lee TI, Young RA (2000) Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* 34: 77-137
- Lobe CG (1992) Transcription factors and mammalian development. *Curr Top Develop Biol* 27: 351-383, 1992
- Matsumara Y, Uchida S, Kondo Y, Miyazaki H, Ko SB, Hayama A, Mirimoto T, Liu W, Arisawa M, Sasaki S, Marumo F (1999) Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nat Genet* 21: 95-98

- Meyyappan M, Atadja PW, Riabowol KT (1996) Regulation of gene expression and transcription factor binding activity during cellular aging. *Biol Signals* 5: 130–138
- Miyamura N, Matsumoto K, Taguchi T, Tokunaga H, Nishikawa T, Nishida K, Toyonaga T, Sakakida M, Araki E (2003) Atypical Bartter syndrome with sensorineural deafness with G47R mutation of the beta-subunit for CIC-Ka and CIC-Kb chloride channels, barttin. *J Clin Endocr Metab* 88: 781-786
- Murre C, McCaw PS, Baltimore D (1989) A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56: 777–783
- Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108: 475-487
- Norman C, Runswick M, Pollock R, Treisman R (1988) Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell* 55: 989-1003
- Nozu K, Inagaki T, F, XJ, Nozu Y, Kaito H, Kanda K, Sekine T, Igarashi T, Nakanishi K, Yoshikawa N, Iijima K, Matsuo M (2008) Molecular analysis of digenic inheritance in Bartter syndrome with sensorineural deafness. *J Med Genet* 45: 182-186
- Ohlsson A, Sieck U, Cumming W, Akhtar M, Serenius F (1984) A variant of Bartter's syndrome: Bartter's syndrome associated with hydramnios, prematurity, hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Acta Pediat Scand* 73: 868-874
- Pachulski RT, Lopez F, Sharaf R (2005) Gitelman's not so benign syndrome. *New Eng J Med* 353: 850-851

- Peters M, Jeck N, Reinalter S, Leonhardt A, Tonshoff B, Klaus G, Konrad M, Seyberth HW (2002) Clinical presentation of genetically defined patients with hypokalemic salt-losing tubulopathies. *Am J Med* 112: 183-190
- Petryniak B, Staudt LM, Postema CE, McCormack WT, Thompson CB (1990) Characterization of chicken octamer-binding proteins demonstrates that POU domain-containing homeobox transcription factors have been highly conserved during vertebrate evolution". *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1099–1103
- Queller DC, Strassmann JE, Hughes CR (1993) Microsatellites and kinship. *Trends Ecol Evol* 8: 285-288
- Ramos E, Hall-Craggs M, Demer LM (1980) Surreptitious habitual vomiting simulating Bartter's syndrome. *J Am Med Assoc* 243: 1070-1072
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354
- Schlingmann KP, Konrad M, Jeck N, Waldegger P, Reinalter SC, Holder M, Seyberth HW, Waldegger S (2004) Salt wasting and deafness resulting from mutations in two chloride channels. *New Eng J Med* 350: 1314-1319
- Scholl UI, Choi M, Liu T, Ramaekers VT, Hausler MG, Grimmer J, Tobe SW, Farhi A, Nelson-Williams C, Lifton RP (2009) Seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, and electrolyte imbalance (SeSAME syndrome) caused by mutations in KCNJ10. *Proc Nat Acad Sci* 106: 5842-5847
- Seyberth HW, Rascher W, Schweer H, Kuhl PG, Mehls O, Scharer K (1985) Congenital hypokalemia and hypercalciuria in preterm infants: a hyperprostaglandinuric tubular syndrome different from Bartter syndrome. *J Pediat* 107: 694-701

- Shalev H, Ohali M, Kachko L, Landau D (2003) The neonatal variant of Bartter syndrome and deafness: preservation of renal function. *Pediatrics* 112: 628-633
- Shein HM, Enders JF (1962) Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48: 1164-1172
- Simon DB, Nelson-Williams C, Bia MJ, Ellison D, Karet FE, Molina AM, Vaara I, Iwata F, Cushner HM, Koolen M, Gainza FJ, Gitleman HJ, Lifton RP (1996 – 1) Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet* 12: 24-30
- Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, Di Pietro A, Sanjad SA, Lifton RP (1996 – 2) Bartter's syndrome, hypokalemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nature Genet* 13: 183-188
- Simon DB, Karet FE, Rodriguez-Soriano J, Hamdan JH, DiPietro A, Trachtman H, Sanjad SA, Lifton RP (1996 – 3) Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K⁺ channel, ROMK. *Nat Genet* 14: 152-156
- Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA, Nelson-Williams C, Mendonca E, Stone R, Schurman S, Nayir A, Alpay H, Bakkaloglu A, Rodriguez-Soriano J, Morales JM, Sanjad SA, Taylor CM, Pilz D, Brem A, Trachtman H, Griswold W, Richard GA, John E, Lifton RP (1997) Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nature Genet* 17: 171-178
- Stoff JS, Stemerman M, Steer M, Salzman E, Brown RS (1980) A defect in platelet aggregation in Bartter's syndrome. *Am J Med* 68: 171-180
- Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG (1999) Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* 9:140-147

Zarraga Larrondo S, Vallo A, Gainza J, Muniz R, Garcia Erauzkin G, Lampreabe I (1992) Familial hypokalemia-hypomagnesemia or Gitelman's syndrome: a further case. *Nephron* 62: 340-344

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	schematische Darstellung eines Nephrons (nach einer Public-Domain-Abbildung via wikipedia.de)	6
Abbildung 1.2	schematische Darstellung einiger Transport- mechanismen am proximalen Tubulus	8
Abbildung 1.3	schematische Darstellung einiger Transport- mechanismen im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife	9
Abbildung 1.4	schematische Darstellung einiger Transport- mechanismen im distalen Konvolut	10
Abbildung 1.5	schematische Darstellung einiger Transport- mechanismen im Sammelrohr	11
Abbildung 1.6	Transmembran-Topologie von ClC-Ka (NCBI Structure summary, MMDB ID 46958)	18
Abbildung 1.7	schematische Darstellung einiger Transport- mechanismen in der Stria vascularis des Innenohrs	20
Abbildung 2.1	schematische Darstellung der Primer und der entstehenden Fragmente mit und ohne Deletion von <i>CLCNKB</i> (nach Schlingmann et al., 2004)	37
Abbildung 2.2	die chemische Reaktion hinter der Biolumineszenz von <i>Renilla reniformis</i> (nach Promega Technical Manual TM058)	42
Abbildung 2.3	schematische Darstellung des für die Renilla-Luciferase kodierenden Vektors pRL-SV40 (nach Promega Technical Manual pRL-SV40)	42
Abbildung 2.4	die chemische Reaktion hinter der Biolumineszenz von <i>Photinus pyralis</i> (nach Promega Technical Manual TM058)	43

Abbildung 2.5	schematische Darstellung des für die Photinus-Luciferase kodierenden Vektors pGL3 (nach Promega Technical Manual pGL3)	44
---------------	---	----

Abbildung 3.1.	graphische Darstellung der Lumineszenz-Messwerte nach Expression des Wildtyp-Promotors in HEK-Zellen	52
----------------	--	----

Abbildung 3.2.	graphische Darstellung der Lumineszenz-Messwerte nach Expression des G832A-Promotors in HEK-Zellen	52
----------------	--	----

Abbildung 3.3.	graphische Darstellung der Lumineszenz-Messwerte nach Expression des Wildtyp-Promotors in MDCK-Zellen	53
----------------	---	----

Abbildung 3.4.	graphische Darstellung der Lumineszenz-Messwerte nach Expression des G832A-Promotors in MDCK-Zellen	53
----------------	---	----

Abbildung 3.5.	graphische Darstellung der Lumineszenz-Messwerte nach Expression des Wildtyp-Promotors in MDCT-Zellen	54
----------------	---	----

Abbildung 3.6.	graphische Darstellung der Lumineszenz-Messwerte nach Expression des G832A-Promotors in MDCT-Zellen	54
----------------	---	----

Abbildung 3.7	graphische Darstellung der Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen der Promotor-Mutation G832A	56
---------------	--	----

Abbildung 4.1.	graphische Darstellung der Lumineszenz-Messwerte nach Expression des G832A-Promotors in MDCK-Zellen für Renilla-Lumineszenzen unter 9.000	66
----------------	---	----

Abbildung 4.2.	Darstellung der linearen Regressionskurven für den Wildtyp- und den G832A-Promotor nach Expression in MDCK-Zellen	67
----------------	---	----

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	genetische, sowie klinische Klassifikation des Bartter-Syndroms, betroffene Gene, sowie Genprodukte und ihre Lokalisation entlang des Nephrons	12
Tabelle 1.2	Beispiele für TF-Familien, TFen und die von ihnen erkannten DNS-Sequenzen	25
Tabelle 2.1	Auflistung der Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien sortiert nach Anwendungsgebiet	30
Tabelle 2.2	Auflistung der Bezugsquellen der verwendeten Geräte sortiert nach deren Bezeichnung	31
Tabelle 3.1	Gegenüberstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte in den untersuchten Zelllinien; der relativen Leuchintensitäten, deren Standardabweichungen, sowie des Signifikanzniveaus der Differenzen zwischen Wildtyp-Promotor und dem G832A-Promotor	55

9. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

aBS/HPS	antenatales Bartter-Syndrom / Hyperprostaglandin-E-Syndrom
BERA	Hirnstamm-Audiometrie (<i>brainstem evoked response audiometry</i>)
bp	Basenpaar
bHLH	Helix-loop-helix-Transkriptionsfaktor (basic helix-loop-helix)
BS	(klassisches) Bartter-Syndrom
BSND	antenatales Bartter-Syndrom mit sensoneuraler Taubheit
bTF	basaler Transkriptionsfaktor
Cl ⁻	Chloridion(en)
COX 2	Cyclooxygenase 2
DBD	DNS-bindende Domäne (eines TFs)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ENaC	Amilorid-sensitiver epithelialer Na ⁺ -Kanal
GS	Gitelman-Syndrom
H ⁺	Wasserstoff-Ion(en), Proton(en)
HEK	Zelllinie: <i>human embryonic kidney</i>
K ⁺	Kaliumion(en)
Mg ²⁺	Magnesium-Ion(en)
Na-K-ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
Na ⁺	Natriumion(en)
NCCT	Thiazid-sensitiver Na ⁺ -Cl ⁻ -Symporter
NKCC1	Furosemid-sensitiver Na ⁺ -K ⁺ -2 Cl ⁻ -Kotransporter, Typ 1
NKCC2	Furosemid-sensitiver Na ⁺ -K ⁺ -2 Cl ⁻ -Kotransporter, Typ 2
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDA	persistierender Ductus arteriosus
RNS	Ribonukleinsäure

ROMK	ATP-sensitiver einwärts-gleichrichtender Kaliumkanal
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SSD	Signal-sensitive Domäne (eines TFs)
SSLP	Mikrosatellit (<i>simple sequence length polymorphism</i>)
SSW	Schwangerschaftswochen
TAD	Trans-aktivierende Domäne (eines TFs)
TAL	dicker aufsteigender Teil der Henle'schen Schleife (<i>thick ascending loop</i>)
tAL	dünner aufsteigender Teil der Henle'schen Schleife (<i>thin ascending loop</i>)
TF	Transkriptionsfaktor

10. Lebenslauf

Lutz Pelken
geboren 16. März 1975
Anschrift Goethestr. 42
35043 Marburg
e-mail pelken@med.uni-marburg.de
Familienstand verheiratet

Schule / Ausbildung

1981 – 1985 Grundschule, Ibbenbüren
1985 – 1994 Goethe-Gymnasium, Ibbenbüren
1988 – 1994 Gasthörer Mathematik und Informatik, Universität
Osnabrück
1994 – 1996 Studium Mathematik, Universität Osnabrück
Abschluss: Vordiplom
1996 – 2003 Studium Humanmedizin, Universität Münster
Praktisches Jahr: Kreiskrankenhaus Herford
(Chirurgie, Innere)
ev. Krankenhaus Bielefeld (Pädiatrie)
Abschluss: Staatsexamen

Berufstätigkeit

seit August 2003 Assistenzarzt im Medizinischen Zentrum für Kinder- und
Jugendmedizin (Prof. Dr. R. F. Maier)

11. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren

in Bielefeld Otte,

in Herford Balzer, Schmitz-Huebner, Winde

in Münster Arolt, Assmann, Böcker, Bürger, Fuchs, Harms, Heindel, Hertle,
Huckenbroich, Jürgens, Kohl, Kunze, Luger, Muthny, Nippert,
Peters, Ringelstein, Schmitz, Senninger, Speckmann, Wittkowski,
Würthwein

12. ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel "Funktionelle Untersuchung der Bedeutung der Mutation G832A des *CLCNKA*-Promotors bei einer Patientin mit renalem Salzverlust und Taubheit" im Medizinischen Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin unter Leitung von Prof. Dr. S. Waldegger mit Unterstützung durch Dr. K.-P. Schlingmann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 21. April 2011